

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**IDENTIFICATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION LIANT LE
PROMOTEUR DU GÈNE D'APOLIPOPROTÉINE D LORS DE STRESS
CELLULAIRE ET NEUROLOGIQUE**

**THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE**

**PAR
LOUIS-CHARLES Jr LEVROS**

AVRIL 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

À la fin de cette belle aventure, je tiens à remercier mon directeur de doctorat, le Dr Éric Rassart, qui m'a accueilli dans son laboratoire depuis le début de mon initiation à la recherche scientifique. Je le remercie de m'avoir poussé à aller plus loin, à évoluer dans ce domaine et aussi pour la grande marge de liberté et de confiance qu'il m'a conféré afin de mener ce travail de recherche à terme. Encore une fois, j'ai eu l'honneur de faire partie de son équipe de recherche en biologie moléculaire.

Je tiens à adresser ma profonde reconnaissance aux Drs Fathey Sarhan, Nicolas Pilon et Judes Poirier pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner et de siéger comme membre du jury. J'ai pu bénéficier de leurs critiques et conseils qui ont contribué à l'amélioration de cette thèse.

J'adresse également un remerciement aux Drs Manuel Buscarlet et Sonia Do Carmo pour leurs nombreux conseils, réflexions et soutiens qu'ils m'ont procurés à de nombreuses reprises. Je salue leur dévouement à la science et, à leur manière, ils ont su amplifier mon intérêt et ma motivation envers celle-ci.

Je remercie aussi la Dre Elsy Édouard pour ses encouragements et nos discussions scientifiques tout au long de ma thèse. Ses critiques scientifiques de même que ses questions soulevées m'ont été d'une aide profonde dans l'accomplissement de plusieurs projets.

Ma gratitude va aussi à Maryline Labrie pour sa collaboration à la fin de mon projet de thèse. Ce fut un plaisir de partager ces moments avec elle, surtout les fins de semaine où plusieurs résultats intéressants ont vu le jour.

Je remercie aussi M. Denis Flippo pour son aide lors des analyses par microscopie à fluorescence et confocale de même que les Drs Borhanne Annabi et Richard Desrosiers qui m'ont permis de collaborer dans leurs projets respectifs et m'ont fait voir d'autres horizons.

Je remercie aussi, toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire. Ils ont tous, à leur manière, rendu agréable mon séjour dans ce laboratoire. Particulièrement, Fadila Larguet, Cyndia Charfi, Ouafa Najib et Chrinie Toufaily. Je vous considère comme des sœurs que je n'ai jamais eues.

Je tiens à dédier cette thèse à mes chers parents, Louis-Charles et Annette Levros et mes frères, Louis-Patrick, Louis-Philippe et Louis-Richard. Je les remercie pour leur grande patience, leur soutien incommensurable et leur intérêt envers ma passion à la recherche scientifique.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	XIII
LISTE DES SYMBOLES	XVII
RÉSUMÉ GÉNÉRAL.....	XIX
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1.1 INTRODUCTION.....	1
1.1.1 Structure de la protéine	2
1.1.2 Rôles d'APOD	4
1.1.3 Expression génique d'APOD	8
1.1.5 Structure du promoteur et du gène.....	16
1.1.6 Les facteurs de transcription	19
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	23
CHAPITRE II	
CHARACTERIZATION OF NUCLEAR FACTORS MODULATING THE APOLIPOPROTEIN D PROMOTER DURING GROWTH ARREST : IMPLICATION OF PARP-1, APEX-1 AND ERK1/2 CATALYTIC ACTIVITIES	25
2.1 AVANT-PROPOS	26
2.2 RÉSUMÉ	27
2.3 ABSTRACT	28
2.4 INTRODUCTION.....	29
2.5 MATERIALS AND METHODS	32
2.5.1 Cell culture and reagents	32
2.5.2 Whole cell and nuclear extracts.....	32
2.5.3 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)	32
2.5.4 Affinity purification of nuclear factors.....	33

2.5.5 Western blot	34
2.5.6 Semi-quantitative RT-PCR and siRNA transfections.....	34
2.5.7 Luciferase assays	35
2.5.8 Statistical analysis	35
2.6 RESULTS	36
2.6.1 Purification and identification of nuclear factors binding the apoD promoter	36
2.6.2 PARP-1, HnRNP-U, Kif4, BUB-3 and APEX1 bind to the apoD promoter in vitro.....	37
2.6.3 mRNA expression of nuclear factors in growth-arrested NIH/3T3 cells	38
2.6.4 Transactivation of the apoD promoter	38
2.6.5 Effect of Parp-1 and MEK1/2 inhibitors on the apoD gene expression	39
2.7 DISCUSSION	41
2.8 ACKNOWLEDGMENTS.....	46
2.9 FIGURE LEGENDS	49
2.10 SUPPLEMENTAL MATERIAL	56
CHAPITRE III	
LISTE DES PROTÉINES NUCLÉAIRES EXTRAITS DE CERVEAUX DE SOURIS SAINES OU INFECTÉES AVEC LE CORONAVIRUS HUMAIN OC43 POUVANT INTERAGIR AVEC LE PROMOTEUR HUMAIN D' <i>APOD</i>	
3.1 AVANT-PROPOS	59
3.2 RÉSULTAT ET DISCUSSION	60
3.2.1 Facteurs de transcription généraux.....	60
3.2.2 La protéine Ccar1.....	61
3.2.3 La protéine Pin1	62
3.2.4 La protéine Stxbp1	62
3.2.5 Les protéines nucléoline et Frap1.....	63
3.2.6 Les familles de facteur nucléaire.....	63
3.2.7 Les protéines HnRNPs	64
3.2.8 Protéines associées aux maladies neurodégénératives.....	64
3.2.9 Les protéines MAPK.....	65
3.2.10 Récepteurs cellulaires, facteur de croissance et AMPK.....	66

3.2.11 Le complexe « <i>COP9 signalosome</i> » et le système ubiquitine-protéasome	66
3.2.12 Les « <i>Kinesin</i> », « <i>Dynein</i> », « <i>Importin</i> », MAPT et les protéines endocytiques	67
CHAPITRE IV	
BINDING AND REPRESSIVE ACTIVITIES OF APOLIPOPROTEIN E3 AND E4 ISOFORMS ON THE HUMAN APOD PROMOTER	80
4.1 AVANT-PROPOS	81
4.2 RÉSUMÉ	82
4.3 ABSTRACT	83
4.4 INTRODUCTION.....	84
4.5 MATERIALS AND METHODS	86
4.5.1 Cell culture and reagents	86
4.5.2 Virus and mice infection	86
4.5.3 Nuclear extract.....	86
4.5.4 Affinity purification of nuclear factors and mass spectrometry	87
4.5.5 siRNA transfections	87
4.5.6 Luciferase assays	88
4.5.7 Immunofluorescence and confocal microscopy.....	88
4.5.8 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)	88
4.5.9 Analysis of gene expression in Allen Brain Atlas (ABA), GENSAT and The transcriptomic Atlas of the mouse Neocortical layers.....	89
4.5.10 Statistical analysis.....	89
4.6 RESULTS	90
4.6.1 Purification and identification of nuclear factors binding the proximal human <i>APOD</i> promoter <i>in vitro</i>	90
4.6.2 APOE localizes in the nucleus of U87, U373M and HepG2 cell lines.....	91
4.6.3 APOE3 and E4 bind the <i>APOD</i> promoter <i>in vivo</i>	91
4.6.4 APOE3 and E4 repress the <i>APOD</i> promoter activity	92
4.6.5 <i>ApoD</i> and <i>ApoE</i> expression correlation in the mouse cortex layers	92
4.6.6 <i>ApoD</i> and <i>ApoE</i> expression correlation in the mouse cortex layers	93
4.7 DISCUSSION	94
4.8 ACKNOWLEDGMENTS.....	99

4.9 FIGURE LEGENDS	103
4.10 SUPPLEMENTARY MATERIAL	109
CHAPITRE V	
THE CORONAVIRUS OC43 NON-STRUCTURAL PROTEIN NS2 BINDS AND TRANSACTIVATE THE APOLIPOPROTEIN D PROMOTER	112
5.1 AVANT-PROPOS	113
5.2 RÉSUMÉ	115
5.3 ABSTRACT	116
5.4 INTRODUCTION.....	117
5.5 MATERIALS AND METHODS	119
5.5.1 Cell culture and reagents	119
5.5.2 Virus and mice infection	119
5.5.3 Extraction of total proteins.....	119
5.5.4 Western blot	119
5.5.5 Luciferase assays	120
5.5.6 Semi-quantitative RT-PCR	121
5.5.7 Statistical analysis	121
5.6 RESULTS	122
5.6.1 Ns2 binds and regulates the <i>APOD</i> promoter	122
5.6.2 Modulation of neuroinflammatory factors in transgenic mice for the human <i>APOD</i> gene.....	122
5.7 DISCUSSION	124
5.8 ACKNOWLEDGMENTS.....	127
5.9 FIGURE LEGENDS	129
CHAPITRE VI	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	134
6.1 CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	134
6.2 PERSPECTIVES	137
ANNEXE A	
DOPAMINE INHIBITS PROEIN L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE AT BOTH PROTEIN AND GENE LEVELS IN SH-SY5Y CELLS	141

ANNEXE B	
SIGNAL TRANSDUCING FUNCTIONS FROM THE MEMBRANE BOUND MATRIX METALLOPROTEINASE MT1-MMP IMPACT ON THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE TRANSLOCASE TRANSCRIPTIONAL REGULATION.....	152
ANNEXE C	
EVIDENCE FOR TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE GLUCOSE-6- PHOSPHATE TRANSPORTER BY HIF-1ALPHA : TARGETING G6PT WITH MUMBAISTATIN ANALOGS IN HYPOXIC MESENCHYMAL STROMAL CELLS....	162
ANNEXE D	
MODULATION OF APOLIPOPROTEIN D EXPRESSION AND TRANSLOCATION UNDER SPECIFIC STRESS CONDITIONS.....	163
RÉFÉRENCES	164

LISTE DES FIGURES

FIGURE	Page
1.1 Structure tertiaire de la protéine APOD liant la progestérone.	3
1.2 Structure du gène d' <i>APOD</i> humaine.	18
2.1 Purification of nuclear proteins binding to the SRE1-EBS-GRE elements of the human APOD promoter.	51
2.2 Binding of HnRNP-U, PARP-1, Kif4, BUB-3 and APEX-1 to the apoD promoter.	52
2.3 Analysis of mRNA expression of nuclear factors in NIH/3T3 growth arrested cells.	53
2.4 ApoD mRNA induction in growth-arrested cells and siRNA analysis.	54
2.5 Analysis of ApoD mRNA expression in presence of Parp-1 and MEK1/2 inhibitors.	55
S2.1 Mutation in the catalytic domain of APEX-1 stimulates proliferation during serum starvation.	57
4.1 Sequence of the proximal <i>APOD</i> promoter and biotinylated primers used for amplification of smaller overlapping regions.	105
4.2 Analysis of cellular localization of APOE in U87 and U373 cells.	106
4.3 APOE interacts with the <i>APOD</i> promoter in vivo.	107
4.4 Regulation of the <i>APOD</i> promoter by APOE isoforms.	108
4.1S Representative in situ hybridizations of <i>ApoD</i> and <i>ApoE</i> genes in the mouse cortex during development.	110
4.2S Representative in situ hybridations of <i>ApoD</i> and <i>ApoE</i> genes in the mouse brain.	111
5.1 Ns2 transactivates the <i>APOD</i> promoter.	130
5.2 Western blot analysis of ApoD expression in the cortex of OC43-WT or OC43delNs2-infected mice.	131
5.3 Western blot analysis of inflammatory factors in the cortex of OC43-WT-infected mice.	132
5.4 Analysis of <i>Cox-2</i> , <i>Stat-1</i> and <i>-3</i> gene expression in the cortex, hippocampus and cerebellum of OC43-WT-infected mice.	133
A.1 Éléments de réponses du promoteur du gène <i>PIMT</i> .	147

A.2 Représentation schématique des mutants délétionnels du promoteur <i>PIMT</i> .	149
A.3 Séquence en nucléotide et en acides aminés de <i>PIMT</i> .	150
A.4 Représentation schématique des mutants du gène <i>PIMT</i> obtenus par mutagenèse dirigée.	151
B.1 Éléments de réponse du promoteur du gène <i>G6PT</i> .	157
B.2 Représentation schématique des mutants délétionnels du promoteur <i>G6PT</i> humain.	159
B.3 Effet de l'acide chlorogénique (CHL) sur l'expression de COX-2 en conditions inflammatoire et hypoxique.	160
B.4 Effet de siG6PT sur l'expression de COX-2 en conditions inflammatoire et hypoxique.	161

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	Page
1.1 Facteurs modulant l'expression génique d' <i>ApoD</i> .	16
2.1 Oligonucleotides used for the binding assay in EMSA and the streptavidin-biotin technique.	47
2.2 Primers used for gene expression analysis by RT-PCR and mutagenesis.	48
3.1 Liste des facteurs de transcription liant le promoteur d' <i>APOD</i> dans le cortex de souris saines ou infectées par le coronavirus humain OC43.	70
4.1 Selected identified proteins from the mass spectrometry analysis binding the <i>APOD</i> promoter.	100
4.2 FPKMs values for <i>ApoD</i> and <i>ApoE</i> genes.	101
4.3 Pearson's correlation of <i>ApoE</i> expression compared with <i>ApoD</i> gene expression.	102
5.1 Identification of Ns2 protein of the OC43 virus by mass spectrometry analysis.	128
A.1 Séquences des amorces ayant permis l'amplification par PCR des mutants délétionnels du promoteur <i>PIMT</i> .	144
A.2 Séquences des amorces pour la mutagenèse dirigée du gène <i>PIMT</i> .	145
B.1 Séquences des amorces ayant permis l'amplification par PCR des mutants délétionnels du promoteur <i>G6PT</i> .	155

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

A	Adénine
a.a.	Acide aminé
AA	Acide arachidonique
ABA	Allen Brain Atlas
ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AIF	Apoptosis inducing factor
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
AP	Activating protein
Apo	Apolipoprotéine
APP	Alternance de purines et de pyrimidines
APRE	Acute phase response element
ARNhn	ARN hétérogène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Attil	<i>Arabidopsis thaliana</i> temperature-induced lipocalin
BBP	Protéine liant la biline
BC	Complexe binaire
BSA	Bovine albumin serum
BUB3	Budding uninhibited by benzimidazoles 3
C	Cytosine
CB	Complexe binaire
CBF-A	CArG-box Binding Factor A
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine et amplification par PCR

CK	Caséine kinase
CNS	Central nervous system
COX	Cyclo-oxygenase
CQ	Complexe quaternaire
CREB	Élément de réponse à l'AMPC
CS	Compétition spécifique
CSF	Cerebrospinal fluid
CT	Complexe tertiaire
CTP	Cytosine triphosphate
Ctrl	Contrôle
DAG	Diacylglycérol
DEX	Dexaméthasone
DHA	Acide docosahéxaénoïque
DHT	Dihydroxytestostérone
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPI	Days post infection
DTT	Dithiothréitol
E47	Séquence reconnue par TAL-1
EBS	ETS-binding site
ECL	Lésion au cortex entorhinal
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique, sel disodique
EGTA	Acide éthylèneglycol tétraacétique
E3M2H	Acide E-3-méthyl-2-hexénoïque
ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
ETS	E-twenty-six Transforming Specific
FSE	Fat response element
G	Guanine
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCDFP-24	Gross cystic disease protein-24kDa

GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLaz	Glial Lazarillo
GRE	Glucocorticoid response element
GTP	Guanosine triphosphate
HCoV-OC43	Human coronavirus OC43
HDL	High density lipoprotein
HnRNP	Heterogeneous ribonucleoprotein
HRE	Ha-ras response element
HSV-1	Herpes simplex virus
IK	Ikaros
IL	Interleukine
IFN γ	Interféron gamma
INS	Insecticyanine
IRF	Facteur régulateur de l'interféron
Ka	Constante d'affinité
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
Kif4	Kinesin superfamily protein 4
KO	Knock-out
KLF2	Gène du facteur homologue au Kruppel
LCAT	Lécithine : cholestérol acyl transférase
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MAD	Mitotic arrest defective
MEM	Minimum essential medium
MMP	Matrix metalloproteinase
MOPS	Acid 3-(N-Morpholino)-propanesulfonique
MRE	Metal response element
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NE	Nuclear extract

NF	Nuclear factor
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLS	Nuclear localization signal
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NP-40	Tampon de solubilisation des protéines: Nonidet P-40
NPC	Niemann-Pick de type C
Oligo	Oligonucléotide
³² P	Isotope 32 du phosphate
PADPr	Poly (ADP)-ribose
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
Pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase chain reaction
PDAPP	Précurseur de la protéine amyloïde sous contrôle du promoteur du facteur de croissance « platelet-derived β »
PMSF	Phénylméthylsulfonyl
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PQ	Paraquat
PRE	Progesterone response element
Pré-ARNm	ARNm précurseur
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RAR	Retinoic acid receptor
RBP	Retinol binding protein
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Transcription inverse associée à une PCR
SDR	Sterol dependent repressor

SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SRE	Élément de réponse au sérum
SRF	Facteur de réponse au sérum
SSC	Tampon salin citrate de sodium
SREBP	Sterol regulatory element binding proteins
STAT	Signal transducers and activators of transcription
STD	Standard de poids moléculaire
STRE	Stress response element
T	Thymidine
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBI	Lésion traumatique au cerveau
T β IE	Élément inhibiteur du facteur de croissance transformant β
TC	Complexe tertiaire
TCF	Facteur de complexe tertiaire
Tg	Transgénique
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumour necrosis factor alpha
TRE	Thyroid-hormone response element
TRIS	Tampon Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TTP	Thymidine triphosphate
UNR	Unrelated
VLDL	Very low density lipoprotein
WT	Wild-type

LISTE DES SYMBOLES

Ci	Curie, unité de mesure d'activité d'une source radioactive
°C	Température en degrés Celsius
g	Force centrifuge
h	Heure
l	Litre
m	Milli, 10^{-3}
min	Minute
mol	Mole
%	Pourcentage
rpm	Rotation par minute
sec	Seconde
U	Unités
uv	rayons ultraviolets
V	Volt, unité de mesure de différence de potentiel
α	alpha
γ	gamma
n	Nano, 10^{-12}
μ	Micro, 10^{-6}

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Depuis la découverte de l'apolipoprotéine D (ApoD) en 1973 par McConathy et Alaupovic et malgré de grandes avancées, la fonction et les mécanismes de régulation de cette protéine demeurent toujours inconnus. Quoi qu'il en soit, toutes les études faites jusqu'à présent semblent montrer qu'elle serait une protéine importante et bénéfique tant en situation normale que pathologique. Son expression génique est détectée chez presque tous les mammifères de même que chez les plantes, les insectes et certaines espèces d'oiseaux. Chez l'humain, elle est exprimée dans plusieurs tissus et hautement exprimée dans les glandes surrénales, la rate, les poumons, le cerveau, le placenta, et les reins. Par contre, chez le rat et la souris, l'expression est limitée au système nerveux central (SNC), ce qui en fait un bon modèle d'étude de la régulation génique d'*ApoD*. En effet, l'*APOD* est induite dans plusieurs cas de neuropathologies chez l'humain tel que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, la sclérose en plaques, la schizophrénie ainsi que dans certains cancers. L'ApoD est également induite dans plusieurs modèles de neurodégénérescence chez la souris et sa surexpression confère une neuroprotection. En corrélation avec ces faits, il est suggéré que l'*APOD* soit une protéine de stress pouvant être considérée comme marqueur de pathologies d'ordre neurologique d'où l'importance d'une étude plus approfondie. Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'éclaircir un tant soit peu les mécanismes régulant l'expression génique d'*APOD* lors de divers stress cellulaires. Effectivement, ces travaux présentent la purification et la caractérisation des facteurs nucléaires Parp-1, HnRNP-U, CBF-A, BUB-3, Kif4, APEX-1 et Ifi204 liant les éléments régulateurs SRE, EBS et GRE du promoteur d'*APOD* lors de l'arrêt de croissance par déprivation de sérum. L'activité enzymatique des protéines Parp-1, APEX-1 et ERK1/2 semble être importante dans l'induction de l'expression génique d'*APOD*. Sachant que l'expression d'*APOD* et la prolifération cellulaire sont inversement corrélées dans plusieurs types de cellules, ces résultats permettent d'éclaircir les mécanismes impliqués. Dans un même ordre d'idée, les résultats présentés dans cette thèse montrent l'identification de plusieurs centaines de protéines liant le promoteur d'*APOD*, dans la région -816 à + 64, provenant de cortex de souris saines ou infectées par un coronavirus humain causant une neurodégénérescence. Parmi ces protéines, l'ApoE et la protéine non-structurale Ns2 du coronavirus lient le promoteur d'*APOD*. Ces résultats suggèrent aussi que les isoformes E3 et E4 d'APOE humaines soient des répresseurs tandis que Ns2 activerait le promoteur *in vivo*. De plus, il est mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression d'*ApoD* et d'*ApoE* notamment au niveau du cortex de souris. Considérant que l'allèle E4 est un facteur génétique important dans le développement de la maladie d'Alzheimer et que les coronavirus sont associés à des désordres neurologiques tels que la sclérose en plaques, ces résultats ouvrent une porte permettant d'investiguer plus en profondeur, et vers une nouvelle direction, les mécanismes impliqués non seulement dans la régulation du gène d'*APOD* mais aussi dans les maladies neurodégénératives.

Mots-clés: Apolipoprotéine D, arrêt de croissance, inflammation, facteur de transcription, coronavirus OC43, spectrométrie de masse

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 INTRODUCTION

Dans les années 60, des études immunochimiques décrivaient les composants antigéniques et hétérogènes des lipoprotéines de haute densité (HDL) (Ayrault Jarrier et al., 1963). En 1973, McConathy et Alaupovic identifiaient l'apolipoprotéine D (ApoD) pour la première fois comme l'un des composants des HDL₃ du plasma, d'où son appellation, et à un moindre degré dans les lipoprotéines de basse et de très basse densité (LDL, VLDL; (Camato et al., 1989; McConathy and Alaupovic, 1973; McConathy and Alaupovic, 1976; Vezina et al., 1988). Par la suite, le gène d'*APOD* a été cloné et séquencé par Drayna et ses collègues dans les années 80. Il est à noter que l'analyse de sa séquence en acide aminé (a.a.) révélait son faible degré d'homologie avec les autres apolipoprotéines. En effet, l'APOD a été classée dans la famille des lipocalines ou α -2microglobulines (Drayna et al., 1986) caractérisée de par leur capacité à lier de petites molécules hydrophobes via leur structure tertiaire en forme de baril, et à réguler les mécanismes impliqués dans le cycle cellulaire (Flower, 1994). Relatif à cette caractéristique structurelle, l'APOD a été reconnue comme étant identique à la protéine GCDFP-24 (« Gross Cystic Disease Fluid Protein-24 »; Balbin *et al.*, 1990), une protéine capable de lier la progestérone et la prégnénolone, et se retrouvant à de très hautes concentrations dans le fluide kystique mammaire (Dilley et al., 1990; Pearlman et al., 1973). Plusieurs autres molécules hydrophobes sont liées par l'APOD telles que la bilirubine, le cholestérol et l'acide arachidonique bien que ces propriétés restent à être démontrées *in vivo*. L'expression génique d'*APOD* est augmentée dans plusieurs désordres neurologiques ainsi que plusieurs autres pathologies telles que l'obésité, le diabète et le cancer. Au vu des nombreuses études faites à partir de modèles de neurodégénérescence chez la souris, il apparaît évident que l'APOD soit une protéine de stress ayant un rôle neuroprotecteur (Do Carmo et al., 2008; Elliott et al., 2010).

1.1.1 Structure de la protéine

L'APOD humaine est une glycoprotéine sécrétée et plasmatique d'environ 30 KDa faisant partie de la famille des lipocalines et constituée de 169 a.a. à la suite d'un clivage d'un peptide signal de 20 a.a. hydrophobes. Toutefois, cette masse moléculaire apparente peut varier entre 19 et 32 KDa sur SDS-PAGE de par son taux de glycosylation sur les résidus d'asparagine, en position 45 et 78 (Schindler et al., 1995; Yang et al., 1994) et contribuent à 18% de sa masse totale (Rassart et al., 2000; Weech et al., 1991). Grâce à 5 cystéines contenues dans sa structure primaire, 2 ponts disulfures sont engendrés à partir des cystéines en position 41 et 165 de même qu'en position 8 et 114 et contribuant en partie à sa structure tridimensionnelle. La cystéine 116, quant à elle, est absente chez toutes les espèces de vertébrés et serait impliquée dans des liaisons disulfures avec d'autres protéines plasmatiques, comme certains membres de la famille des apolipoprotéines, dont l'APOA-I ou la CETP (« Cholesterol ester transfer protein ») et l'APOA-II (Blanco-Vaca et al., 1992; Weech et al., 1991; Yang et al., 1994) et pourrait aussi lier la Lécithine Cholestérol Acyl-Transférase (LCAT; Fielding and Fielding, 1980) et le récepteur de la leptine (Liu et al., 2001), amenant à la formation de complexes.

Malgré le faible pourcentage d'homologie de séquence en a.a. distingué parmi les membres des lipocalines, la structure tridimensionnelle d'APOD justifie, en toute logique, le choix de ce classement. En effet, Drayna et ses collègues (1986) ont déduit la séquence en a.a. d'APOD à partir du gène. L'analyse de la structure du gène, plus précisément l'organisation exons-introns, montre une forte homologie avec les gènes de la superfamille des α -2microglobulines, incluant 25% d'a.a. homologues avec la protéine humaine liant le rétinol (RBP; Drayna et al., 1986). La structure tridimensionnelle des membres de cette famille tel que la protéine liant la biline (BBP) de *Pieris brassicae* et l'insecticyanine (INS) de *Manduca sexta* a été déterminée par cristallographie aux rayons X et présente une structure en forme de baril composé de huit feuillets bêta antiparallèles reliés par des boucles et créant une cavité de liaison hydrophobe. À partir des coordonnées atomiques de ces protéines, un modèle moléculaire a été proposé pour la structure tertiaire d'APOD (Peitsch and Boguski, 1990). Cette caractéristique a permis de suggérer un rôle pour cette famille

comme protéines transporteuses de molécules hydrophobes (Rassart et al., 2000). Par la suite, des analyses de cristallographie de la protéine APOD humaine purifiée confirmaient ces propriétés structurales (Eichinger et al., 2007). Dans cette étude, plusieurs caractéristiques spécifiques à l'APOD furent démontrées (voir Figure 1.1). Notamment, la cavité plutôt en forme d'entonnoir, distincte des autres lipocalines, permettrait sa liaison avec des molécules diversifiées telles que la progestérone et l'acide arachidonique. Trois des quatre boucles (A/B, E/F et G/H) situées à proximité de l'entrée de la cavité et de nature hydrophobe permettraient aussi son interaction avec les HDL. L'extrémité opposée à l'entrée et en forme de cône serait probablement impliquée dans l'interaction d'APOD avec un récepteur cellulaire hypothétique. On remarque aussi que l'APOD comporte peu de structure en hélice α amphipathiques, une caractéristique importante des autres apolipoprotéines. Une hélice alpha en c-terminal est située sur le côté du baril et une autre petite hélice 3_{10} ferme l'ouverture du côté conique (Eichinger et al., 2007).

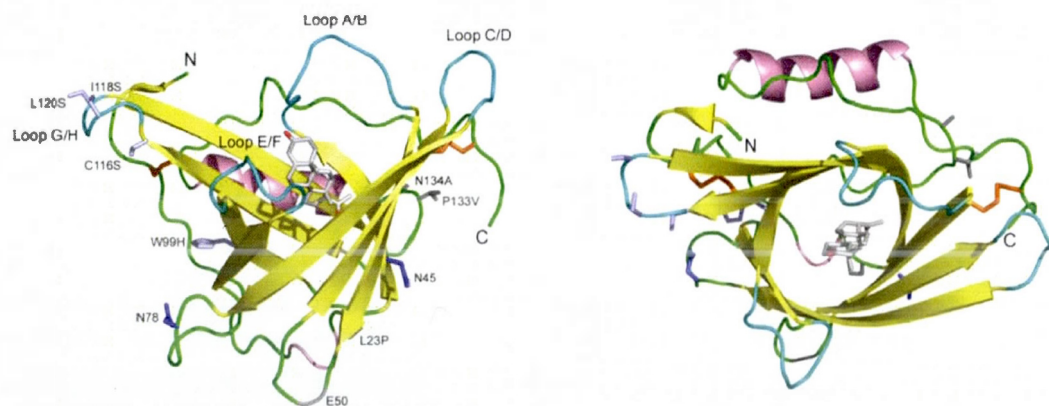


Figure 1.1. Structure tertiaire de la protéine APOD liant la progestérone. Illustration transversale et axiale de la protéine dont les feuillets bêta sont montrés en jaune, les boucles hydrophobes à l'entrée de la cavité (« loop » A/B, /C/D, E/F et G/H) en bleu et les autres boucles du côté opposé en vert, les hélices alpha et 3_{10} en mauve, les ponts dissulfures en orange, les résidus d'asparagine en position 45 et 78 en bleu foncée et la progestérone à l'intérieur de la cavité en gris. Tirée de Eichinger et al., 2007.

1.1.2 Rôles d'APOD

Au vu de ces propriétés structurales décrites dans la littérature, plusieurs ligands pour l'APOD ont été proposés, dont le cholestérol, certaines hormones stéroïdiennes, la bilirubine, un sous-produit de l'hème (Peitsch and Boguski, 1990), l'acide arachidonique (AA), pour lequel elle a le plus d'affinité (Morais Cabral et al., 1995), et l'acide E-3-méthyl-2-héxénoïque (E3M2H), une phéromone présente dans les sécrétions axillaires humaines (Zeng et al., 1996). Seulement quelques-unes d'entre elles seront décrites en lien avec les rôles proposés d'APOD.

1.1.2.1 Le cholestérol

Le cholestérol fait partie intégrante des constituants des membranes cellulaires et est un précurseur des hormones stéroïdiennes impliquées dans plusieurs voies de signalisation (Pfriegeer and Ungerer, 2011). De plus, l'homéostasie du cholestérol dans le système nerveux central (SNC) est indépendante des organes et de la circulation sanguine en périphérie due à la barrière hématoencéphalique qui exclut tout échange entre ces deux systèmes. Ainsi, l'entreposage et le relargage du cholestérol dans tous les organes du corps, à l'exception du cerveau, proviennent de la diète véhiculée par les intestins, la synthèse *de novo* effectuée dans tous les organes et du transport par l'intermédiaire de lipoprotéines à travers la circulation sanguine (Pfriegeer and Ungerer, 2011). Par conséquent, le cholestérol retrouvé dans le cerveau provient uniquement de la synthèse *de novo* et *in situ* catalysé à partir de l'Acétyl Coenzyme A suivi d'une série de réactions complexes impliquant 20 enzymes (Leduc et al., 2010). Un dérèglement du métabolisme du cholestérol ou de son transport est associé à plusieurs maladies neurodégénératives et, tel qu'il sera détaillé plus loin, l'expression d'APOD est augmentée, notamment dans l'Alzheimer (Terrisse et al., 1998), la sclérose en plaques (Reindl et al., 2001) et la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC; Suresh et al., 1998), une maladie génétique affectant le transport du cholestérol à l'intérieur de la cellule (Patel and Pentchev, 1989).

Par le passé, certains auteurs ont spéculé que l'APOD pourrait être impliquée dans le transport d'esters de cholestérol dans le plasma en association avec l'enzyme LCAT et la protéine CETP (Drayna et al., 1986; Fielding and Fielding, 1980; Steyrer and Kostner, 1988). Effectivement, Steyer et Kostner (1988) spéculaient qu'une telle association aurait pour effet de stabiliser l'enzyme LCAT et d'augmenter significativement l'activité d'estérification du cholestérol. Ainsi, l'APOD pourrait participer à un complexe de redistribution du ratio cholestérol/ester de cholestérol à partir des tissus périphériques vers le foie, correspondant à la voie inverse du transport du cholestérol. Sachant que le cholestérol est relâché lors de la dégénération des nerfs, il est probable aussi que l'APOD puisse récupérer cette molécule pour sa réutilisation en la disposant aux sites de régénération (Dilley et al., 1990; Rassart et al., 2000). Cependant, la liaison d'APOD au cholestérol reste un constat incertain puisque Peitsch et Boguski (1990) prétendaient, suite à des analyses de modélisation moléculaire, qu'une telle association serait incompatible avec la structure tertiaire et ont montré la faible affinité d'APOD pour cette molécule, qui était même indétectable (Morais Cabral et al., 1995). Par contre, Patel et ses collègues (1997) montraient que l'APOD peut lier le cholestérol en utilisant une méthode beaucoup plus sensible par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). De plus, dans les astrocytes, l'expression et la sécrétion d'APOD sont régulées par le 25-hydroxycholestérol, un dérivé du cholestérol capable de traverser la barrière hématoencéphalique (Patel et al., 1995). D'autres études présument que la présence d'APOD dans les cellules périvasculaires du cerveau et son rôle de transporteur de petites molécules hydrophobes impliquent un transport de ces molécules à travers la barrière hématoencéphalique (Hu et al., 2001).

1.1.2.2 Les hormones stéroïdiennes

Comme mentionné précédemment, la GCDFP-24, une protéine liant la progestérone et présente en grande quantité dans le fluide kystique mammaire, fut identifiée comme étant l'APOD (Balbin et al., 1990; Pearlman et al., 1973). La maladie fibrokystique du sein est une maladie bénigne affectant 7% des femmes adultes et prédisposant au développement du cancer du sein par un facteur de 2 à 4 fois comparativement à la normale (Sanchez et al., 1992). Dans cette même étude, Sanchez et ses collègues (1992) montrèrent l'absence de

corrélation entre les concentrations de cholestérol et d'APOD dans différentes classes de fluides kystiques basées sur les ratios de K^+/Na^+ (type I) et la concentration d'albumine (type II), et spéculèrent que l'APOD n'est pas impliquée dans l'accumulation de cholestérol dans le fluide kystique mammaire. Finalement, l'APOD aurait des affinités différentes pour les hormones stéroïdiennes: pregnénolone > progestérone > pregnanolone > pregnandione > androgène > œstrogène (Dilley et al., 1990; Lea, 1988; Weech et al., 1991), quoique les constantes d'affinités étaient quand même faibles pour la progestérone ($K_a = 2.5 \times 10^6$ mol/l) et la pregnénolone ($K_a = 1.32 \times 10^6$ mol/l) et nulles dans une autre étude dans le cas de la pregnénolone et la testostérone (Vogt and Skerra, 2001). Ces contradictions peuvent être imputées à la provenance de la protéine APOD purifiée, soit à partir du fluide kystique mammaire (Dilley et al., 1990) soit à partir de la protéine recombinante non-glycosylée exprimée et purifiée de la bactérie *Escherichia coli* (Vogt and Skerra, 2001).

1.1.2.3 L'acide arachidonique

Morais-Cabral et ses collègues (1995) ont montré par spectroscopie de fluorescence que l'acide arachidonique (AA) est un ligand potentiel d'APOD avec une K_a de $1,6 \times 10^8$ mol/l, une liaison 20 fois supérieure à celle de la progestérone. Par contre, l'APOD n'a pas d'affinité pour les métabolites de l'AA qui serait probablement dû à leurs caractères hydrophiles. Sachant que l'AA est l'acide gras le plus important dans le cerveau, plusieurs études ont montré une déficience d'AA dans le plasma et le cerveau de patients schizophréniques impliquant un déséquilibre dans le métabolisme des phospholipides et acides gras. Effectivement, l'AA et l'acide docosahéxaénoïque (DHA) représentent plus de 90% des acides gras polyinsaturés dans le SNC (O'Brien and Sampson, 1965). La forme estérifiée retrouvée dans la double couche lipidique des membranes cellulaires peut être relâchée par des phospholipases suite à un signal extracellulaire. Suite à ce relargage dans le cytoplasme, l'AA agit comme second messager impliqué dans plusieurs voies de signalisation et peut servir comme précurseur pour la synthèse des prostaglandines et des eicosanoïdes (Morais Cabral et al., 1995). Sachant que la LCAT est impliquée dans la conversion de l'AA (forme active) en ester de cholestérol (forme inactive), l'APOD pourrait

séquestrer l'AA prévenant ainsi sa conversion. Ceci laisse envisager un rôle important de la liaison d'APOD avec l'AA dans la régulation cellulaire (Morais Cabral et al., 1995).

1.1.2.4 Les sous-produits de l'hème

À partir d'analyses de modélisation moléculaire, il a été suggéré que les sous-produits de l'hème, comme les bilines, incluant la biliverdine, la bilirubine ainsi que les porphyrines, seraient des ligands plus probables pour l'APOD que le cholestérol (Peitsch and Boguski, 1990). Effectivement, Peitsch et Boguski montraient que l'APOD purifiée liait la bilirubine avec un ratio molaire de 0.8:1. De plus, l'albumine est un transporteur important de la bilirubine dans la circulation sanguine. Toutefois, chez les personnes atteintes d'analbunémie, un défaut génétique rare associé à l'absence d'albumine (Watkins et al., 1994), la clairance de la bilirubine n'est pas affectée. Ceci était dû au fait que chez ces personnes asymptomatiques, la bilirubine était majoritairement associée aux HDL. Par la suite, il a été démontré que l'APOD liait la bilirubine avec un K_a de $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ et favoriserait cette interaction HDL-bilirubine (Goessling and Zucker, 2000). Ainsi, l'APOD pourrait être exprimée localement et viendrait nettoyer ces métabolites toxiques et les acheminer dans la rate où la destruction des érythrocytes a lieu et où l'expression de la protéine est particulièrement élevée (Provost et al., 1990).

1.1.2.5 Rôle multiple d'APOD

À l'exception de la progestérone et de la pregnénolone, aucun des ligands physiologiques d'APOD n'a été identifié. Quoiqu'il en soit, les nombreux rôles proposés sont souvent en rapport avec la fonction des ligands qu'elle peut lier *in vitro*, ce qui fait d'elle une protéine transporteuse multifonctionnelle dont la capacité de lier plusieurs ligands différents est spécifiquement corrélée à son expression tissulaire. Ainsi, l'APOD serait impliquée dans le métabolisme lipidique qui est essentiel aux fonctions des organes. Chez l'humain, les organes exprimant l'APOD sont les glandes surrénales, les poumons, le cerveau, les testicules et la rate entre autres, et ont respectivement un rôle à jouer dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, dans la biosynthèse des surfactants, dans la myélination des neurones, dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes et la croissance des spermatozoïdes, et dans la

destruction des érythrocytes sénescents (Provost et al., 1990). Toutefois, depuis sa découverte qui date de plus de 40 ans et malgré l'identification de nombreux ligands potentiels ainsi que leur grande diversité biochimique, la fonction physiologique d'APOD demeure inconnue. Par contre, il a été suggéré qu'elle soit une protéine ayant plusieurs fonctions spécifiques selon la molécule transportée, les tissus ou l'organe qui l'expriment (Rassart et al., 2000).

1.1.3 Expression génique d'APOD

1.1.3.1 Expression tissulaire

L'expression de l'ARN messager (ARNm) d'APOD est détectable chez presque tous les mammifères étudiés jusqu'à présent, entre autres : le lapin, le rat, la souris, le singe, le porc (Rassart et al., 2000). De plus, la présence du gène chez le poulet (*Gallus gallus*) et des séquences nucléotidiques homologues chez les poissons et les céphalochordées supportent une origine ancestrale d'APOD dans la lignée des chordées (Ganformina et al., 2005). Des homologues d'APOD sont aussi retrouvés chez la bactérie *Escherichia coli* (Blc, « Bacterial lipocalin »; Bishop et al., 1995), la mouche *Drosophila melanogaster* (GLaz, Glial Lazarillo) (Sanchez et al., 2006), la chenille à tente estivale *Hyphantria cunea* (Kim et al., 2005), l'amphioxus (Wang et al., 2007), le blé *Triticum aestivum* L. et la plante *Arabidopsis thaliana* et dont les homologues sont respectivement nommés Tatil (pour *Triticum aestivum* L. « temperature-induced lipocalin ») et Attil (pour *Arabidopsis thaliana* « temperature-induced lipocalin ») (Frenette Charron et al., 2002).

Chez l'humain, l'APOD est exprimée dans plusieurs tissus, comme les ovaires, le pancréas, les testicules, le cerveau, le liquide cérébro-spinal et les nerfs périphériques, et encore plus hautement exprimée dans les glandes surrénales, les poumons, le placenta, les reins et la rate (Drayna et al., 1986; Glockner and Ohm, 2003; Provost et al., 1990; Rassart et al., 2000). L'APOD est aussi exprimée dans les sécrétions lacrymales (Holzfeind et al., 1995) et dans le corps ciliaire de l'œil où la protéine serait sécrétée dans l'humeur aqueuse (Escribano et al., 1995), ainsi que dans les sécrétions axillaires apocrines (Zeng et al., 1996) et dans l'urine (Navarro et al., 2004; Rassart et al., 2000). Chez le singe, le lapin et le porc, la distribution tissulaire des transcrits d'ApoD est comparable à l'humain. Par contre chez le rat

et la souris, l'expression est élevée et limitée au SNC, notamment la moelle épinière, le cervelet et le cerveau (Cofer and Ross, 1996; Seguin et al., 1995), ce qui fait de ce tissu un bon modèle pour l'étude de la régulation génique et de la fonction plausible de cette protéine. Quant au foie et aux intestins, qui sont des sites importants pour les autres apolipoprotéines, l'*APOD* y est peu exprimée (Drayna et al., 1986).

1.1.3.2 Expression cellulaire

L'hybridation *in situ* chez le singe et le lapin montre que l'*ApoD* est surtout exprimée dans les tissus périphériques notamment par les cellules fibroblastiques à proximité des vaisseaux et capillaires sanguins, de même que les nerfs périphériques (Provost et al., 1991b; Smith et al., 1990). Dans ces deux espèces, l'ARNm est aussi détecté dans les cellules neurogliales, les cellules dans l'espace sous-arachnoïdien à la surface du cerveau incluant les cellules piales et périvasculaires et les neurones éparses. De plus, chez le lapin, l'*ApoD* est plus fortement exprimée dans les cellules gliales de la matière blanche du SNC que dans la matière grise, notamment dans le cerveau, le cervelet, le bulbe rachidien et la moelle épinière. Ces cellules gliales de la matière blanche exprimant l'*ApoD* seraient probablement des oligodendrocytes ou des astrocytes (Provost et al., 1991b). Chez le rat, la protéine ApoD est présente à différents taux dans les astrocytes et les oligodendrocytes et fortement dans les cellules de la pie et l'arachnoïde (Boyles et al., 1990b).

Chez l'humain, des études d'immunohistochimie montrent la présence d'APOD dans les mêmes régions du SNC que celles observées pour l'expression génique chez le lapin et le singe, de même que dans les cellules fibroblastiques et périvasculaires du plexus choroïde et de la pie-mère (Navarro et al., 2004; Navarro et al., 1998). Toutefois, la protéine APOD n'est pas détectée dans les neurones du cortex cérébral (Navarro et al., 1998). Il est à noter que dans le SNC, il existe deux types d'astrocytes: 1) protoplasmiques, retrouvés essentiellement dans la matière grise et 2) fibreux, retrouvés dans la matière blanche. En condition physiologique et surtout lors d'atteintes au SNC causant des lésions, ce sont les astrocytes activés qui sont impliqués dans les mécanismes de réparation par ce qu'on appelle la gliose, en surexprimant la protéine GFAP (« *Glial Fibrillary Acidic Protein* »), aussi considérée

comme marqueur d'astrocytes activés. Ainsi, Navarro et ses collègues montrent que dans la matière blanche, l'APOD est fortement exprimée dans les oligodendrocytes et aussi extracellulairement dans la neuropile, mais pas dans les astrocytes fibreux positifs pour la GFAP (Navarro et al., 2004). Des constats intéressants observés dans cette étude et méritants d'être mentionnés sont que 1) les astrocytes GFAP-positifs étaient beaucoup plus nombreux dans la matière blanche que grise, 2) quelques astrocytes protoplasmiques éparses de la matière grise étaient GFAP- et APOD-positifs, 3) dans cette matière grise, l'APOD était détectée à des taux plus bas que dans la matière blanche. Ce même patron d'expression protéique d'APOD a aussi été observée dans le cervelet (Navarro et al., 2004). Ainsi, les auteurs de cette étude suggèrent que les oligodendrocytes de la matière blanche soient les principales cellules exprimant l'APOD, lui conférant un rôle important dans cette région du SNC. Notamment, l'APOD pourrait être impliquée dans le transport du cholestérol et d'acides gras nécessaire au maintien de la myéline, un constituant important des oligodendrocytes. Une autre étude montre aussi la présence de la protéine APOD dans des cellules précurseurs d'oligodendrocytes dans le cortex cérébral humain, de même que dans les cellules périvasculaires et dans les lysosomes des péricytes localisés sur la paroi des vaisseaux sanguins (Hu et al., 2001). Chez le rat et la souris, des analyses de transcriptomes confirment clairement que les oligodendrocytes sont les principales cellules exprimant l'ARNm d'*ApoD* dans le SNC (Cahoy et al., 2008; Schaeren-Wiemers et al., 1995).

Toutefois, l'expression de l'ARNm de même que la protéine *APOD*/APOD dans les astrocytes sont non négligeables comme démontré dans plusieurs autres études effectuées chez l'humain (del Valle et al., 2003; Kalman et al., 2000). De plus, l'expression génique et protéique d'*APOD*/APOD sont augmentées dans les astrocytes et les neurones chez les personnes âgées (del Valle et al., 2003; Kalman et al., 2000; Navarro et al., 2010) et aussi dans le cortex cérébral (Kim et al., 2009; Navarro et al., 2010). Chez les souris transgéniques pour le gène d'*APOD* humaine sous le contrôle du promoteur *Thy-1* (spécifique aux neurones), l'activation des astrocytes étaient augmentée lors de l'infection à un coronavirus comparativement aux souris contrôles (Do Carmo et al., 2008). *In vitro*, l'ApoD est aussi synthétisée et sécrétée constitutivement par les astrocytes primaires de souris nouveau-nées et

cette sécrétion peut être stimulée par le 25-hydroxycholesterol suggérant, encore une fois, un rôle pour l'ApoD dans le métabolisme du cholestérol au niveau du SNC (Patel et al., 1995).

1.1.3.3 Expression associée aux pathologies

1.1.3.3.1 Les maladies neurodégénératives

L'expression d'APOD est grandement augmentée dans plusieurs situations pathologiques dans le SNC, en particulier dans l'hippocampe (Terrisse et al., 1998), le cortex entorhinal (Belloir et al., 2001), le cortex temporal (Kalman et al., 2000) et le liquide cérébro-spinal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de la méningo-encéphalite, de la démence, de la maladie des neurones moteurs (Terrisse et al., 1998), de Parkinson (Ordonez et al., 2006), de la sclérose en plaques (Reindl et al., 2001), dans le cortex préfrontal de sujets schizophréniques et bipolaires (Thomas et al., 2001), de la maladie des prions (Dandoy-Dron et al., 1998) et de la maladie de Niemann-Pick (Suresh et al., 1998).

Plusieurs études ont montré l'implication d'ApoD dans les processus de réparation neuronale. Notamment, lors de la régénération des cellules nerveuses dans le SNP en réponse à une lésion des nerfs sciatiques, les productions d'ARNm et de la protéine *ApoD*/ApoD sont respectivement 40 et 500 fois plus importantes (Boyles et al., 1990a). D'autres expériences, utilisant les modèles de lésions neuronales excitotoxiques, induite par l'acide kainique dans l'hippocampe de rats, révèlent que les neurones pyramidaux destinés à la mort cellulaire surexpriment l'ApoD (Montpied et al., 1999; Ong et al., 1997; Ong et al., 1999). L'ApoD est également induite dans d'autres modèles de neuropathologie incluant: les lésions traumatiques au cerveau (TBI pour « *Traumatic brain injury* ») causées par percussions contrôlées du cortex (Franz et al., 1999), les lésions du cortex entorhinal (ECL pour « *entorhinal cortex lesion* ») en réponse à des décharges électriques (Terrisse et al., 1999), les modèles murins de maladie neurodégénérative comme les souris NPC mimant la maladie de Niemann-Pick de type C (Suresh et al., 1998) ainsi que les souris transgéniques PDAPP (pour précurseur de la protéine amyloïde sous contrôle du promoteur du facteur de croissance « *platelet-derived β* ») causant une pathologie apparentée à l'Alzheimer (Johnson-Wood et al., 1997; Masliah et al., 1996).

L'expression génique d'*ApoD* est aussi induite dans le SNC de souris infectées par des virus causant des encéphalites, telles que le HSV-1 (herpes simplex type-I virus; Kang et al., 2003b), le virus Sindbis (Johnston et al., 2001), JEV (Japanese encephalitis virus; Saha and Rangarajan, 2003), le virus de la rage (Prosniak et al., 2001) et le coronavirus humain OC43 (HCoV43) injecté intracorticalement chez les souris C57BL/6 et causant une neuropathologie sévère associée à une réponse inflammatoire (Do Carmo et al., 2008). Dans ce dernier modèle de neurodégénérescence, l'équipe du Dr Rassart a montré que l'expression génique d'*ApoD* est augmentée de cinq et sept fois respectivement dans le cortex et l'hippocampe comparativement à des souris saines. De plus, plusieurs études rapportent un rôle neuroprotecteur pour l'*ApoD* (del Valle et al., 2003; Desai et al., 2005; Franz et al., 1999; Khan et al., 2003; Navarro et al., 2008; Ordonez et al., 2006; Terrisse et al., 1999; Thomas et al., 2001). Effectivement, la surexpression d'*APOD* dans les neurones de souris transgéniques pour l'*APOD* humaine confère une neuroprotection contre l'infection au virus OC43 ainsi que contre des insultes oxydatives causées par le paraquat (Do Carmo et al., 2008; Ganfornina et al., 2008). De plus, des drosophiles transgéniques pour le gène *GLaz*, l'homologue d'*APOD*, ou pour l'*APOD* humaine sont protégées contre différents stress et leur durée de vie est augmentée (Muffat et al., 2008; Walker et al., 2006).

L'augmentation des taux d'*ApoD* dans diverses neuropathologies et dans les lésions cérébrales expérimentales chez le rat et la souris suggèrent que l'*ApoD* serait une protéine de stress pouvant être considérée comme marqueur de pathologies d'ordre neurologique (Elliott et al., 2010; Hu et al., 2001; Navarro et al., 2004) et aussi de certains types de cancer (Aspinall et al., 1995; Diez-Itza et al., 1994) détaillés dans la section suivante. Par ailleurs, il est spéculé dans la littérature que l'*ApoD* puisse être impliquée dans les mécanismes de réparation et de régénération dans le SNP ou dans le nettoyage de molécules neurotoxiques à la suite de la mort cellulaire (Boyles et al., 1990a; Boyles et al., 1990b; Navarro et al., 2004; Spreyer et al., 1990) ou encore en tant que molécule antioxydante (Elliott et al., 2010; Ganfornina et al., 2008; Muffat et al., 2008; Walker et al., 2006).

1.1.3.3.2 Les cancers

Comme signalé précédemment, on détecte des niveaux élevés d'APOD dans la plupart des cancers. En effet, dans le fluide kystique mammaire de femme atteinte d'une forme bénigne de tumeur de sein, la concentration d'APOD est 1000 fois plus élevée que dans le plasma (Balbin et al., 1990). Concernant ce fait, une hypothèse a été émise stipulant que l'APOD serait impliquée dans la liaison et le transport d'hormones stéroïdiennes dans les tissus mammaires humains et dans la formation de kystes (Balbin et al., 1990; Sanchez et al., 1992). De plus, la concentration d'APOD est particulièrement plus élevée dans les carcinomes différenciés que ceux modérément ou faiblement différenciés (Lopez-Boado et al., 1996; Lopez-Boado et al., 1994). Ainsi, il a été suggéré que l'APOD soit considérée comme marqueur de pronostique dans les cancers du sein (Diez-Itza et al., 1994) où elle serait associée à la régression tumorale. L'existence d'une relation entre l'expression élevée d'APOD et la progression vers un phénotype plus différencié, donc moins invasif, tant *in vivo* qu'*in vitro*, a été citée plusieurs fois par les chercheurs dans le domaine. De plus, le promoteur d'*APOD* se trouve hyperméthylé et est associé à une répression de l'expression génique dans les tumeurs malignes non endocrines incluant les cancers du côlon (Ogawa et al., 2005), les carcinomes hépatiques (Utsunomiya et al., 2005) et le cancer de l'oesophage (Yamashita et al., 2002). Les auteurs de ces études décrivent l'APOD comme un suppresseur de tumeur et dont les faibles taux d'expression seraient corrélés à un stade avancé des cancers, à la métastase dans les noeuds lymphatiques et à un faible taux de survie.

Il a aussi pu être démontré qu'une expression plus grande d'APOD dans les kystes mammaires est associée à une baisse de progression en carcinome (Sanchez et al., 1992), de même que dans les astrocytomes pilocytiques à faible taux de prolifération qui sont une forme de carcinome non agressive et potentiellement curable. Les formes malignes et invasives, comme les astrocytomes fibrillaires, sont fatales et négatives par immunomarquage pour l'APOD (Hunter and Moreno, 2002). Il existe d'autres tumeurs cérébrales primaires, bénignes et potentiellement curables comme les gangliomes, les astrocytomes de cellules géantes subependymales, les xantoastrocytomes pléomorphiques et où l'APOD pourrait être associée à la formation de kystes et être considérée comme marqueur important de

diagnostique dans la différenciation tumorale. Sachant que le traitement thérapeutique pour les astrocytomes pilocytiques et fibrillaires est bien distinct, le pronostic doit être précis (Hunter et al., 2002). L'APOD se retrouve également en concentration élevée dans le cancer de la prostate (Aspinall et al., 1995; Zhang et al., 1998).

1.1.3.4 Induction d'APOD *in vitro*

En culture cellulaire, après l'ajout de certaines substances comme l'interleukine (IL)-1 α (Blais et al., 1994), la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (Lopez-Boado et al., 1997), l'acide rétinoïque (Lopez-Boado et al., 1996; Lopez-Boado et al., 1994), de certains androgènes (le DHT et le DEX) ou de glucocorticoïdes dans les cellules cancéreuses primaires comme les ZR-75-1 (cellules épithéliales mammaires; Lopez-Boado et al., 1996) et les LNCaP (cellules cancéreuses de la prostate; Simard et al., 1990; Simard et al., 1992; Simard et al., 1991), l'APOD est induite, alors que la prolifération cellulaire s'en trouve réduite (voir Table 1.1). Cette corrélation observée *in vitro* implique une voie de signalisation probablement commune à celle empruntée lors de la différenciation tumorale mentionnée précédemment. Toutefois, l'effet contraire est observé après l'ajout d'œstrogènes et d'IL-6. Dans le cas de l'IL-6, l'induction d'APOD et la prolifération cellulaire sont parallèlement inhibées, contrairement aux autres substances où elles sont inversement corrélées (Blais et al., 1995; Lopez-Boado et al., 1996; Rassart et al., 2000). De la même façon, dans les cultures primaires d'astrocytes, l'APOD est régulée à la hausse par la progestérone et les oxystérols, dont le 25-hydroxycholestérol, et est sécrétée de façon constitutive plutôt qu'accumulée intracellulairement (Patel et al., 1995). Ceci suggère un rôle potentiel de cette protéine transporteuse de molécules hydrophobes dans l'homéostasie du cholestérol durant la réinnervation et la régénération (del Valle et al., 2003; Navarro et al., 2004; Patel et al., 1995). De plus, lorsque des cellules fibroblastiques humaines et murines, de même que les lignées astrocytiques humaines U87 et 373M sont mises en arrêt de croissance que ce soit par confluence ou suite à une déprivation de sérum ou après plusieurs passages impliquant les mécanismes de sénescence, l'expression génique d'APOD est augmentée suggérant un rôle potentiel dans l'homéostasie cellulaire (Do Carmo et al., 2002; Provost et al., 1991a).

Ainsi, l'APOD peut-être considérée comme marqueur de sénescence. Les cellules tumorales sénescents en phase G₀ semblent être bénéfiques pour les patients atteints de cancers (Campisi, 2005b; Soiland et al., 2007). Par contre, cet effet semble néfaste, avec des propriétés invasives, lorsque des cellules sénescents surexprimant l'APOD sont à proximité de tissus tumoraux (Soiland et al., 2007). Ces effets contradictoires d'APOD sur les cellules cancéreuses peuvent être expliqués par plusieurs mécanismes suivants: 1) Les tissus ou cellules non sénescents sécrètent des inhibiteurs de métalloprotéinases (MMP) et serpinés empêchant l'invasion de cellules cancéreuses, contrairement aux tissus sénescents qui sécrètent des MMP (Kang et al., 2003a), des facteurs de croissance épithéliaux (Campisi, 2005a; Parrinello et al., 2005) et des cytokines inflammatoires et induisent l'invasion des cellules cancéreuses et les métastases (Kang et al., 2003a); 2) l'APOD sécrétée par ces cellules sénescents à proximité des tumeurs pourrait interagir avec les MMP et avoir une activité protéolytique en dégradant le collagène et favorisant l'invasion tumorale (Soiland et al., 2007). De ces faits, l'APOD peut être considérée comme " *un bon citoyen, mais un mauvais voisin* " (reformulé de Soiland et al., 2007; " *ApoD is a good citizen but a bad neighbour* " et de Campisi, 2005a; " *Good citizens, bad neighbors* ").

Par ailleurs, nous avons récemment démontré que plusieurs stress (tels que les radiations UV et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)) causant un arrêt de croissance dans les cellules fibroblastes murines (NIH/3T3), induisent l'expression d'ApoD. Nous avons aussi montré qu'en condition normale, la localisation intracellulaire d'ApoD est principalement périnucléaire, mais se retrouve dans le cytoplasme et le noyau en conditions de stress, incluant en présence de lipopolysaccharide (LPS) (Do Carmo et al., 2007). L'ApoD nucléaire proviendrait de la protéine sécrétée et nous spéculons qu'elle pourrait jouer un rôle de transporteur de ligands extracellulaire et dans la régulation transcriptionnelle dans le noyau. Concernant la prolifération cellulaire, l'ApoD serait capable de lier les protéines MAPK ou ERK1/2 et empêcher leur entrée dans le noyau (Sarjeant et al., 2003). Sachant que les protéines ERK1/2, impliquant la voie de signalisation MAPK, sont des régulateurs importants de la phase G₁ à S du cycle cellulaire (Meloche and Pouyssegur, 2007), l'ApoD pourrait inhiber l'entrée du cycle cellulaire en phase S.

Tableau 1.1. Facteurs modulant l'expression génique d'*ApoD*.

Conditions	Effets sur l'expression d' <i>ApoD</i>	Prolifération cellulaire	Références
Androgènes et glucocorticoïdes	↗	↘	(□□□)
Estrogènes	↘	↗	(3)
Interleukine-1 α	↗	↘	(4)
Interleukine-6	↘	↘	(5)
1,25-dihydroxy vitamine D3	↗	↘	(6)
Acide rétinoïque	↗	↘	(7;8)
Déprivation de sérum	↗	↘	(7;9)
Confluence cellulaire	↗	↘	(9)
Régénération des nerfs	↗	↘	(10)
Lipopolysaccharides (LPS)	↗	↗	(11)
Radiations UV	↗	↘	(11)
H ₂ O ₂	↗	↘	(11)

* Références : (1-3) Simard et al., 1990; 1991; 1992; (4;5) Blais et al., 1994; 1995; (6-8) Lopez-Boado et al., 1997; 1994; 1996; (9) Provost et al., 1991; (10) Boyles et al., 1990a; (11) Do Carmo et al., 2007. Tiré de Rassart et al., 2002.

1.1.5 Structure du promoteur et du gène

Les gènes *d'APOD/ApoD* ont été localisés sur le chromosome 3 dans la région p14.2 chez l'humain (Drayna et al., 1987a) et le chromosome 16 chez la souris (Warden et al., 1992). Ce gène est divisé en cinq exons, dont le premier, non-codant et faisant 66 pb, est situé à 4,7 kb en amont du deuxième exon (Rassart et al., 2000 ; voir Figure 1.2). De plus, l'analyse des gènes des lipocalines montre que leur localisation chromosomique ainsi que leur organisation exon/intron, en particulier chez les mammifères, est typique de la famille des lipocalines (Salier, 2000). L'ADNc de ce gène de 20 kpb a une longueur de 815 pb et son promoteur, ainsi que l'exon 1, comporte une série d'éléments de régulation potentiels. Étalaé sur plus de 2 kpb, ce promoteur dévoile la complexité de la modulation du gène *d'APOD* (Lambert et al., 1993).

1.1.5.1 Les éléments cis du promoteur d'*APOD*

Plusieurs éléments régulateurs se retrouvent sur le promoteur d'*APOD* tels que les éléments de réponses à l'œstrogène (ERE), à la progestérone (PRE), au glucocorticoïde (GRE), à l'hormone thyroïdienne (TRE), de phase aiguë (APRE) et au sérum (SRE). Des

études sur le promoteur du gène d'*APOD*, effectuées par l'équipe du Dr Rassart, démontrent qu'il existe des éléments importants impliqués dans la surexpression d'*APOD* dans des situations de stress cellulaire. Ces études ont porté, plus particulièrement, sur des cellules fibroblastiques murines NIH/3T3 mises en condition de stress tel que l'arrêt de croissance par déprivation de sérum ou par confluence cellulaire et les stress inflammatoires et oxydatifs, tels que mentionnés dans la section 1.1.3.4. Ainsi, la région entre les nucléotides -174 et -4 du promoteur serait responsable de l'expression basale. Quant à la région entre les nucléotides -558 et -179, elle serait impliquée dans l'induction de l'expression génique d'*APOD* lors de l'arrêt de croissance par déprivation de sérum. Ces résultats ont été démontrés par des expériences de délétion de différentes régions du promoteur d'*APOD* et en mesurant l'activité promotrice de ces constructions grâce au gène de la luciférase (Do Carmo et al., 2002). Dans la région entre les nucléotides -558 et -179, on retrouve la paire d'éléments de réponse au sérum (SRE1 et 2), au ETS (EBS) et au glucocorticoïde (GRE) de même qu'une région d'alternance purine-pyrimidine (APP) capable d'adopter une conformation d'ADN-Z associée à l'activation et la répression de gènes de mammifères (Gilmour et al., 1984; Hamada et al., 1984). L'analyse par retard sur gel de ces éléments régulateurs, excepté pour l'élément APP, révèle qu'ils sont spécifiquement impliqués dans l'induction d'*APOD* en arrêt de croissance par interaction avec des protéines nucléaires, d'où l'importance d'identifier les facteurs liant ces éléments et pouvant fort bien être responsables de la régulation génique d'*APOD*.

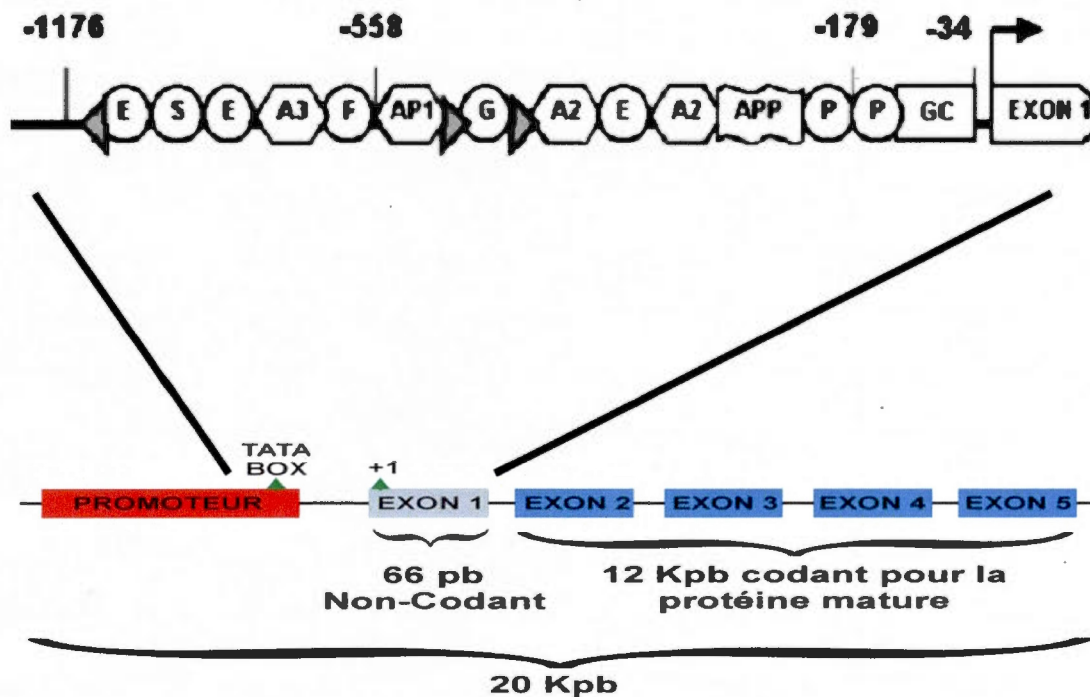


Figure 1.2. Structure du gène d'*APOD* humaine. Le gène contient 5 exons dont le premier est non codant. Son promoteur présente plusieurs éléments régulateurs potentiels impliqués dans la modulation génique d'*APOD*. AP-1: Protéine activatrice 1, APP : Alternance de purines et de pyrimidines, A-2 et -3 : Élément de réponse de phase aiguë 2 et 3, G : Élément de réponse aux glucocorticoïdes, GC: Boîte GC, E : Élément de réponse à l'œstrogène, F : Élément spécifique aux acides gras, SRE: Élément de réponse au sérum, P : Élément de réponse à la progestérone, S : Élément de réponse au stress. La région -174 à -4 est responsable de l'expression basale, alors que la région -558 à -179 serait impliquée dans l'induction d'*APOD* lors de l'arrêt de croissance. (Tirée de Do Carmo *et al.*, 2002).

1.1.5.2 Caractérisation du SRE et de la boîte CArG

1.1.5.2.1 L'élément de réponse au sérum (SRE)

Le SRE a été originellement décrit comme un élément de 23 pb ayant des répétitions inversées de symétrie dyade et dont la séquence est : aggatgtCCatattaGGacatct (Miano, 2003; Treisman, 1986). Le SRE serait lié de façon constitutive à un complexe de deux facteurs de transcription : le facteur de réponse au sérum SRF (pour « *Serum Response Factor* ») et le complexe ternaire TCF (pour « *Tenary Complex Factor* ») (Ramirez et al., 1997) et ces trois éléments seront détaillés davantage dans la section 1.1.6.3.

1.1.5.2.2 La boîte CArG

La boîte CArG, pour sa part, est un élément cis de 10 pb qui ne présente pas de symétrie dyade, caractéristique du SRE. Cet élément a pour séquence consensus; CC(A/T)⁶GG et une seule mutation, habituellement une substitution au centre A/T par un C ou un G, est acceptée pour considérer cet élément régulateur comme « *CArG-like element* » (Miano, 2003). La boîte CArG est en fait le cœur du SRE, mais ces deux éléments sont tout à fait distincts l'un de l'autre. Plus de 60 gènes ont été fonctionnellement caractérisés, ont une ou plusieurs boîtes CArG sur leur promoteur et interagissent activement avec des facteurs de transcription. La majorité de ces gènes a été classée dans la catégorie de gènes associés aux muscles ou associés à la croissance (ex. : le *c-Fos*; Gille et al., 1995; Latinkic et al., 1996).

1.1.6 Les facteurs de transcription

Il existe plus de 20 000 gènes dans le génome humain qui, selon les différents niveaux d'expression, expliquent la présence de plus de 200 types de cellules chez l'humain. Parmi ces gènes, plus de 2000 codent pour des facteurs de transcription ; des protéines nucléaires essentielles à l'initiation de la transcription et associées à l'ARN polymérase. Ces protéines nucléaires sont en général des facteurs de transcription, coactivateurs, corépresseurs, remodeleurs de chromatine, histones, histones acétylases, déacétylases, kinases et méthylases. Les facteurs de transcription contiennent au moins deux domaines caractéristiques : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de régulation de la transcription. Lors de l'étude de facteurs de transcription, plusieurs questions peuvent être

posées. Par exemple, est-ce qu'un facteur de transcription influence directement l'activité de transcription? Est-ce que le facteur, une fois synthétisé, se rend automatiquement au noyau pour agir sur la transcription? Si ce facteur requiert un signal pour être actif, quelle est la nature de ce signal? (Brivanlou and Darnell, 2002). Deux grandes classes peuvent être établies selon qu'ils exercent une action positive ou négative (Brivanlou and Darnell, 2002; Drewett et al., 2001). Les facteurs de transcription ayant une action positive peuvent être classés selon qu'ils sont des facteurs nucléaires actifs de façon constitutive, par exemple le Sp1, la protéine liant la séquence CCAAT et le NF1 ou des facteurs de transcription régulateurs comme le p53, le SRF de la famille des «*MADS box*» et le ELK-1 de la famille des «*E-twenty-six*» (ETS) incluant le TCF (Buchwalter et al., 2004).

1.1.6.1 Rôles des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription actifs de façon constitutive sont des protéines présentes en permanence dans le noyau des cellules, et ce peu importe le type cellulaire. Ces protéines ne semblent pas être impliquées dans un changement d'activité transcriptionnelle d'un gène en particulier. Elles joueraient un rôle plus important dans la transcription de gènes qui semblent être toujours transcrits, c'est-à-dire les protéines structurales comme par exemple la tubuline et l'actine, et les enzymes métaboliques ubiquistes comme la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH ; Brivanlou and Darnell, 2002). Parmi les sous-classes de facteurs de transcription régulateurs, il y a celles dites cellules-spécifiques qui apparaissent comme des régulateurs dans le contrôle de la différenciation cellulaire, et celles dites signal dépendant. On retrouve dans cette dernière, les facteurs de transcription nucléaires dits résidents, sur laquelle une plus grande attention sera apportée étant donné que le SRF et le TCF, pouvant agir directement sur l'induction de l'expression d'APOD dans les cellules en arrêt de croissance, font partie de cette sous-classe.

1.1.6.2 Les facteurs de transcription nucléaires résidents

Plus d'une douzaine de cascades de phosphorylation agissent sur les résidus sérines d'une centaine de protéines nucléaires résidentes en réponse à un signal provenant de l'interaction d'un ligand et de son récepteur de surface cellulaire. Deux voies connues peuvent amener à la

phosphorylation des protéines nucléaires résidentes par les cascades des sérines kinases. La première est celle où de petites molécules se lient à leurs récepteurs de surface cellulaire couplés aux protéines G. Ceci amène l'augmentation intracellulaire d'un second messenger comme l'adénosine 3',5'-monophosphate (AMPc), les phosphoinositols, le diacylglycérol (DAG) et le Ca^{2+} qui agissent directement sur les cascades des sérines kinases (Brivanlou and Darnell, 2002). La deuxième voie est celle où un ligand polypeptidique se lie à un récepteur cellulaire tyrosine kinase. Parmi les substrats des sérines kinases, on retrouve la famille des protéines ETS, la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB) et la famille des « *MADs box* ». Plusieurs de ces protéines nucléaires semblent être toujours liées à l'ADN à tout moment avant d'être activées suite à un stress cellulaire.

1.1.6.3 Les facteurs de transcription liant le SRE

Beaucoup d'études ont été effectuées sur les éléments cis SRE et la boîte CArG, retrouvés dans plusieurs promoteurs de gènes précoces, et notamment des gènes musculaires comme l'actine et la myosine. L'un des modèles les plus connus est le SRE du promoteur du proto-oncogène *c-Fos* (Chai et al., 2002; Rech et al., 1994; Treisman, 1986; Treisman, 1990; Treisman et al., 1992). Cette séquence d'ADN est nécessaire et suffisante pour une induction rapide de l'expression de ce proto-oncogène en réponse à un signal cellulaire externe comme les hormones de croissance, le sérum et les esters de phorbol. L'activation totale du SRE nécessite la liaison du TCF (ou p62) et du SRF (ou p67) à leur site de liaison spécifique à l'ADN (Sharrocks, 2001). Beaucoup d'informations ont été accumulées sur l'étroite coopération entre ces deux facteurs de transcription.

1.1.6.3.1 Le SRF

Le SRF ou p67 est une protéine dimérique de 67 KDa faisant partie de la famille des « *MADs box* ». C'est un facteur de transcription ubiquiste reconnu pour lier le SRE et capable de recruter le TCF pour former le complexe ternaire (Sharrocks, 2001). Le SRF semble être localisé de manière constitutive dans la chromatine. Effectivement, des expériences ont démontré que le SRF est lié à l'ADN à tout moment du cycle cellulaire et qu'il est modifié intensivement par phosphorylation et par glycosylation immédiatement après sa synthèse

(Chai et al., 2002). La caséine kinase (CK) II reconnaîtrait les mêmes sites de phosphorylation sur le SRF tant *in vitro* qu' *in vivo*. Cette phosphorylation, de même qu'un stress cellulaire induisant un arrêt de croissance ou après l'ajout d'hormone de croissance, ne semble pas affecter l'activité de liaison du SRF à l'ADN (Chai and Tarnawski, 2002), ce qui vient supporter l'idée que le SRF serait lié à l'ADN immédiatement après sa synthèse et sa translocation au noyau. Toutefois, Atadja et ses collègues (1994) ont montré que l'activité transcriptionnelle du SRF serait réprimée dans les fibroblastes humains en sénescence et que cette répression serait régulée par l'hyperphosphorylation du SRF, inhibant sa liaison au SRE. Sachant que l'*APOD* est induite spécifiquement dans les cellules fibroblastiques non-prolifératives, c'est-à-dire en quiescence ou en sénescence (Provost et al., 1991a), ce constat laisse entrevoir que d'autres facteurs de transcription pourraient combler ce rôle régulateur du promoteur d'*APOD*.

1.1.6.3.2 Le TCF

Le TCF ou p62, quant à lui, est une protéine de 62 KDa et probablement le facteur de transcription le plus étudié parmi les membres de la famille des ETS. Il requiert la formation du complexe binaire SRF-SRE pour lier le SRE (Sharrocks, 2001). Par contre, il peut lier par lui-même l'élément cis EBS (« *Ets Binding Site* ») qui a pour séquence soit CCGGA, soit CAGGA ou soit GGA (Fisher et al., 1991; Hahn and Wasylyk, 1994; Nye et al., 1992; Ramirez et al., 1997). Il est connu dans la littérature que le TCF, communément appelé ELK1 (Drewett et al., 2001; Latinkic et al., 1996; Sharrocks, 2001) peut recruter le SRF à l'élément cis EBS-CArG qui ne lierait pas de SRF. Il est important de mentionner que le SRF peut interagir avec d'autres facteurs de transcription ne provenant pas de la famille des ETS, par exemple ; NFkB, Sp1, GATA4, ATF6 et Pax-5 (Chai et al., 2002; Sharrocks, 2001). Ainsi, il est possible que d'autres facteurs de transcription, connus ou non, autres que le SRF et le TCF puissent lier ces éléments cis de même que les facteurs nucléaires pouvant interagir avec le GRE, situé entre les deux éléments cis SRE.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

L'APOD est une protéine impliquée, d'une façon ubiquiste, dans plusieurs processus biologiques normaux et pathologiques. La complexité de régulation de cette protéine par les différentes voies de signalisation, tant du point de vue cellulaire que moléculaire, nécessite une étude de longue portée. Depuis sa découverte, de grandes avancées ont été réalisées, mais sa fonction physiologique demeure un mystère pour la communauté scientifique. Toutefois, il apparaît évident que l'APOD soit une protéine importante impliquée dans plusieurs pathologies notamment les maladies neurodégénératives et les cancers. L'augmentation de l'expression génique suggère qu'elle soit une protéine de stress et aussi ayant un rôle dans l'homéostasie cellulaire et dans les métabolismes lipidiques. Selon la littérature, elle semble être une protéine neuroprotectrice avec des propriétés antioxydantes. De plus, son expression est fortement induite dans plusieurs modèles de neurodégénérescence chez la souris et inversement corrélée avec la prolifération cellulaire. Eu égard à ces constats expérimentaux, il apparaît important d'étudier plus en profondeur les facteurs nucléaires régissant la régulation de l'expression génique d'APOD, plus précisément dans les cellules en culture en stade G₀ et aussi dans un modèle de neurodégénérescence chez la souris. Cette étude permettra d'enrichir nos connaissances et de comprendre le *modus operandi* de ces processus complexes de régulation du gène d'APOD dans l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que dans les maladies neurodégénératives. La purification, l'identification et la caractérisation de ces facteurs nucléaires permettront probablement de mieux approfondir nos connaissances et d'une manière indirecte sur le rôle d'APOD tant en condition normale que pathologique. En identifiant ces facteurs nucléaires qui seraient importants dans l'induction du gène d'APOD, il serait possible de faire une corrélation avec leurs fonctions connues. Par exemple, l'identification de facteur de transcription qui serait impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes pro- ou anti-inflammatoires (ex: NF- κ B) ou antioxydantes (ex: NRF2) appuierait fort probablement un rôle pour l'APOD dans ces mécanismes cellulaires.

Plusieurs techniques de biologie moléculaire et biochimique seront utilisées afin de mener à terme ces projets. La purification des protéines nucléaires interagissant avec le promoteur d'*APOD* sera effectuée sur des billes de streptavidine couplées aux séquences promotrices biotinylées et correspondant à la région -514 à -475 pour l'étude sur l'arrêt de croissance et à la région -816 à +64 pour l'étude impliquant le modèle de neurodégénérescence. En ce qui concerne ce dernier modèle, la région du promoteur sera divisée en six parties chevauchantes d'environ 200pb et amplifiée par PCR en utilisant des amorces biotinylées. Les protéines nucléaires seront extraites à partir d'un modèle de souris présentant un phénotype neurodégénératif causé par l'infection de souris par le coronavirus humain OC43 et où l'expression génique d'*APOD* est fortement induite, notamment dans le cortex. Les protéines qui lient le promoteur seront éluées et envoyées au centre de protéomique génome Québec de l'Université McGill et analysées par spectrométrie de masse (MS/MS).

Par la suite, il serait important de vérifier l'identité des protéines nucléaires par retard sur gel à l'aide d'anticorps (technique de « *supershift* ») ce qui permettra de confirmer la spécificité de liaison de ces protéines au promoteur d'*APOD*. Bien que ces protéines lient le promoteur d'*APOD* *in vitro*, les conditions peuvent être différentes *in vivo*. Une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), suivie d'une amplification par PCR permettrait de confirmer l'interaction de ces protéines *in vivo* avec le promoteur d'*APOD*. Le niveau d'expression et de traduction de ces protéines devrait être analysé par RT-PCR et immunobuvardage. Cette analyse permettra de voir si ces protéines sont modulées aussi dans ces conditions et indubitablement d'une manière précoce. Finalement, l'activité de ces protéines dans la régulation du gène d'*APOD* peut être étudiée par des expériences de transfection. Des clones, contenant l'ADNc de ces protéines nucléaires, seraient co-transfectés avec une construction contenant le promoteur du gène d'*APOD* et un gène rapporteur, la luciférase. Une activation du gène de la luciférase confirmerait l'implication de ces protéines nucléaires dans l'induction d'*APOD*.

CHAPITRE II

CHARACTERIZATION OF NUCLEAR FACTORS MODULATING THE APOLIPOPROTEIN D PROMOTER DURING GROWTH ARREST : IMPLICATION OF PARP-1, APEX-1 AND ERK1/2 CATALYTIC ACTIVITIES

Louis-Charles Levros Jr., Sonia Do Carmo, Elsy Edouard, Philippe Legault, Cyndia Charfi,
Eric Rassart

2010

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1803 : 1062-71

2.1 AVANT-PROPOS

Ce chapitre présente les protéines purifiées liant le promoteur humain d'*APOD* dans la région -514 à -475 dans les cellules fibroblastiques murines (NIH/3T3) mises en culture en conditions normales ou en arrêt de croissance par déprivation de sérum. Cette étude permettra de caractériser les facteurs nucléaires capables de lier et de transactiver le promoteur d'*APOD*.

J'ai élaboré le design de cette étude sous la supervision du Dr Rassart. J'ai effectué la purification des protéines nucléaires liant le promoteur d'*APOD* par la technique de billes de streptavidine. J'ai aussi analysé les résultats de spectrométrie de masse de même que la caractérisation des protéines sélectionnées pour l'étude, c'est-à-dire le clonage des cDNA dans des vecteurs d'expression, les tests de luciférase, les tests de retard sur gel, les tests de RT-PCR et d'immunobuvardages. Sonia Do Carmo et Philippe Legault ont contribué aux expériences concernant les tests de luciférase et les tests d'ARN interférant.

2.2 RÉSUMÉ

L'apolipoprotéine D (ApoD) est induite dans plusieurs conditions de stress et situations pathologiques comme les maladies neurodégénératives et les cancers. Nous avons récemment montré que l'expression de l'ARNm d'*APOD* est induite dans les cellules en arrêt de croissance et démontré la liaison spécifique de protéines nucléaires à la région -514 à -475 du promoteur. Cette région contient la paire d'éléments de réponse au sérum (SRE1 et 2), un site de liaison aux ETS (EBS) et un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE). Dans cette étude, nous montrons que Parp-1, HnRNP-U, CBF-A, BUB-3, Kif4, APEX-1 et Ifi204 lient ces éléments régulateurs du promoteur d'*APOD*. La liaison spécifique de HnRNP-U et Parp-1 a été confirmée par retard sur gel. Kif4 et BUB-3 lient préférentiellement et respectivement les sites SRE1 et EBS-GRE, alors que APEX-1 semble être recruté indirectement à ces éléments. Nous montrons que l'expression génique de quelques-uns de ces facteurs est régulée à la hausse dans les cellules en arrêt de croissance et que ces protéines transactivent le promoteur d'*APOD*. En accord avec ces résultats, des mutants d'APEX-1 et de Parp-1 défectifs pour leur liaison à l'ADN et leur activité catalytique ne peuvent pas transactiver le promoteur. La suppression des protéines Parp-1 et HnRNP-U par siRNA et l'emploi d'inhibiteurs spécifiques pour MEK1/2 et Parp-1 inhibent l'induction de l'expression génique d'*ApoD*. Par ailleurs, ERK1/2 sont retrouvées activées d'une manière biphasique suite à la déprivation de sérum et l'inhibition de Parp-1 cause une activation soutenue de ERK2 mais pas ERK1 pour une durée de 2 h. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent l'importance de l'activité catalytique de Parp-1, APEX-1 et ERK1/2 dans l'induction de l'expression génique d'*APOD* causée par l'arrêt de croissance.

Mots-clés : Apolipoprotein D (ApoD), stress cellulaire, arrêt de croissance, protéines liant l'ADN, PARP-1, APEX-1, HnRNP-U, IFI204, Kif4, BUB-3, ERK1/2.

2.3 ABSTRACT

Human Apolipoprotein D (apoD) is upregulated under several stress conditions and pathological situations such as neurodegenerative diseases and cancers. We previously showed that apoD mRNA expression is induced in growth-arrested cells and demonstrated the specific binding of nuclear proteins to the region -514 to -475 of the promoter. Such region contains a pair of Serum Responsive Elements (SRE), an Ets-Binding Site (EBS) and a Glucocorticoid Responsive Element (GRE). In this study, we show that Parp-1, HnRNP-U, CBF-A, BUB-3, Kif4, APEX-1 and Ifi204 bind these regulatory elements of the apoD promoter. Specific binding of HnRNP-U and Parp-1 was confirmed by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). In a biotin pull-down assay, Kif4 and BUB-3 bind preferentially the SRE1 and the EBS-GRE sites, respectively, while APEX-1 seems recruited indirectly to these elements. We found that the mRNA expression of some of these binding factors is upregulated in growth-arrested cells and that these proteins also transactivate the apoD promoter. In agreement with these results, mutants of APEX-1 and of Parp-1 defective for their DNA-binding and catalytic activities could not transactivate the promoter. The knockdown of Parp-1 and HnRNP-U and the use of specific inhibitors of MEK1/2 and of Parp-1 also inhibited the induction of apoD gene expression. Moreover, ERK1/2 was found activated in a biphasic manner post serum-starvation and the inhibition of Parp-1 causes a sustained activation of ERK2 but not ERK1 for up to 2h. Altogether, these findings demonstrate the importance of Parp-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities in the growth arrest-induced apoD gene expression.

Keywords : Apolipoprotein D (apoD), Cellular stress, Growth arrest, DNA binding proteins, PARP-1, APEX-1, HnRNP-U, IFI204, Kif4, BUB-3, ERK1/2

2.4 INTRODUCTION

Human apolipoprotein D (apoD) is a 29-kDa secreted glycoprotein and a member of the lipocalin superfamily (Drayna et al., 1987b; Flower, 1996). Since its discovery, which dates for more than 35 years ago (McConathy and Alaupovic, 1973) and despite the identification of a variety of candidate ligands such as arachidonic acid (Morais Cabral et al., 1995), progesterone and pregnenolone (Dilley et al., 1990; Pearlman et al., 1973), bilirubin (Peitsch and Boguski, 1990), E-3-methyl-2-hexenoic acid (Zeng et al., 1996) and cholesterol (Patel et al., 1997), the physiological function of apoD remains unknown. Therefore, apoD is considered as a protein with pleiotropic functions depending on its ligands and its tissues or organs of expression (Rassart et al., 2000).

In human, the apoD gene is expressed at high levels in the adrenal glands, spleen, testes, lungs, pancreas, kidneys and the nervous system (Rassart et al., 2000). ApoD expression is also found increased in several neurological disorders such as Alzheimer's disease, meningoencephalitis, dementia, motor neuron disease (Terrisse et al., 1998), Parkinson's disease (Ordonez et al., 2006), schizophrenia (Thomas et al., 2001) and (Mahadik et al., 2002), multiple sclerosis (Reindl et al., 2001) and several animal models of neurodegenerative injuries (Rassart et al., 2000). Besides neuropathological situations, apoD expression is elevated in several cancers. This overexpression of apoD gene is observed particularly in differentiated tumours with low proliferation rate and several studies suggested the importance of cellular growth arrest as a triggering factor of apoD expression (Lopez-Boado et al., 1996; Lopez-Boado et al., 1994; Soiland et al., 2007). Effectively, in cultured cells, apoD expression is associated with cellular growth arrest, senescence and inflammation. In agreement with these facts, apoD is also upregulated in aging rats (Yang et al., 2005) and humans (Kalman et al., 2000; Loerch et al., 2008) and this senescence characteristic, which is an irreversible growth-arrested state in contrary to quiescence, is also considered as a physiological mechanism capable of counteracting tumour proliferation (Dimri et al., 1996; Goldstein, 1990; Lynch, 2006; McCormick and Campisi, 1991; Pazolli and Stewart, 2008).

Furthermore, apoD expression and proliferation are also inversely correlated in response to cellular stress. Indeed, cellular stresses provoking an extended growth arrest such as high doses of UV light and H₂O₂ increased apoD expression (Do Carmo et al., 2007).

We have already identified the promoter region comprised between -558 and -179 to be responsible for the induction of apoD following growth arrest (Do Carmo et al., 2002). More precisely, we found that the Alternating Purine-Pyrimidine stretch (APP) and two Serum Responsive Elements (SRE-1 and -2) were the major determinants of growth arrest-induced apoD gene expression. The SRE is a 23-bp element with an inverted repeat of dyad symmetry (Miano, 2003). Only the SRE1 of the apoD promoter contains a CArG-box core described as a 10-bp element with the consensus sequence CC(A/T)₆GG. In many growth-related or immediate early genes, the CArG-box element is often in the vicinity of an Ets-Binding-Site (EBS) (Buchwalter et al., 2004; Chai et al., 2002; Latinkic et al., 1996; Miano, 2003; Treisman, 1990). Detailed analysis of the apoD promoter also revealed the presence of an EBS and a Glucocorticoid Responsive Element (GRE) between the two SREs in the region -514 to -475 (Do Carmo et al., 2002). The EBS, with its central core sequence 5'-GGA(A/T)-3', is known to cooperate tightly with the SRE through the binding of several nuclear proteins, particularly the Serum Response Factor (SRF) and members of the *E26 transforming specific* (ETS) family which regulate several genes implicated in cell proliferation and differentiation (Buchwalter et al., 2004; Verger and Duterrque-Coquillaud, 2002). Also, the GRE is known to interact with the Glucocorticoid Receptor (GR), a nuclear receptor ligand-dependant transcription factor which recognizes the consensus sequence 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' (Claessens et al., 2001).

Thus, it appeared important to further study the regulation of the apoD gene, especially in relation with cellular proliferation. As the SREs in the region -558 to -179 were identified as major determinants of growth arrest-induced gene expression, we focused our study on this region of the promoter that contains the SRE1, EBS and GRE sites (Table 2.1). Here, we present the identification and the characterization of several nuclear proteins that bind the

apoD promoter under normal and growth arrest conditions in NIH/3T3 fibroblast cells. Our results show that Parp-1, HnRNP-U, CBF-A, BUB-3, Kif4, APEX-1 and Ifi204 bind elements of the promoter. We also investigated the implication of MEK/ERK pathway in the regulation of the apoD gene expression. We demonstrate the implication of these nuclear factors in the modulation of the apoD promoter and that Parp-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities regulate positively the apoD gene expression in growth arrested-cells.

2.5 MATERIALS AND METHODS

2.5.1 Cell culture and reagents

Mouse fibroblasts (NIH/3T3) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% calf serum, penicillin G (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml). NIH/3T3 cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and were fed every 2 days with fresh medium. For the analysis of gene expression in sparsely growing cultures (normal conditions), cells were maintained in medium supplemented with 10% calf serum and harvested at 50% of confluence. For the analysis in growth arrest conditions, cells were maintained in 0.5% serum when they reached 80% of confluence. Cells were kept in this medium and harvested at different days post serum starvation. When specific inhibitors of Parp-1 or MEK1/2 were used, the medium was replaced by medium containing 10 mM 3-ABA (Sigma, St. Louis, MO) or 10 µM U0126 (Calbiochem EMD Biosciences, San Diego, CA), respectively.

2.5.2 Whole cell and nuclear extracts

For total extracts, 3×10^6 cells were lysed in 100 µl lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 1 mM dithiothreitol (DTT), 100 U/µl aprotinin and 200 µM Sodium orthovanadate (Na₃VO₄)). After 5 min of incubation at 4 °C, lysates were cleared by 10 min of centrifugation at 13,000g at 4 °C. Nuclear extracts (NE) from growing or from 5-day serum starved NIH/3T3 fibroblasts were prepared as described previously (Lahiri and Ge, 2000). The protein concentration was determined at 595 nm using the Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

2.5.3 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Sense oligonucleotides (50 ng) were 5'-end-labeled with T4 polynucleotide kinase and (γ-³²P) ATP and annealed with 200 ng of the complementary oligonucleotide resulting in a double-stranded sequence with SRE1-EBS-GRE elements found in the apoD promoter and

shown in Table 2.1. Nuclear extracts were added to 0.8 ng of the labeled double-stranded oligonucleotide and after 20 min incubation at room temperature, the mixture was run on a 6% acrylamide, non-denaturing gel in 0.5× TBE. The dried gels were autoradiographed on Kodak X-Omat films (Perkin Elmer, Rochester, NY). For competition assays, a 25- and 50-fold excess of cold double-stranded specific and unrelated (UNR) oligonucleotide, shown in Table 2.1, was incubated with the nuclear extracts before addition of labeled oligonucleotide. For supershift assays, 20 and 50 µg of nuclear extracts were incubated with specific antibodies against HnRNP-U (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and Parp-1 (Chemicon, Temecula, CA).

2.5.4 Affinity purification of nuclear factors

The biotinylated oligonucleotides corresponded to the region -514 to -475 of the apoD promoter (SRE1-EBS-GRE) or carried mutations on the cis elements; SRE1 and EBS-GRE. As negative control, the IRU5Cas sequence from the Cas-Br-E retrovirus was used (Table 2.1). Streptavidin beads (500 µg; Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal Biotech, Oslo, Norway) were resuspended and incubated with 1500 pmoles of biotinylated oligonucleotides for 15 min in the buffer W&B (1×) (10 mM of Tris-HCl, pH 7.5, 1 M of NaCl and 1 mM of EDTA) as recommended by the manufacturer. The washing steps were done in the same buffer and the beads linked with the biotinylated oligonucleotides were incubated for 15 min at room temperature with 500 µg of nuclear extracts containing 20 µl of annealing buffer 10× (50 mM of Tris-HCl, pH 7.5, 1 M of NaCl, 100 mM of MgCl₂, 0.2 mM of EDTA and 1 mM of DTT), 1 mg of BSA and 20 µg of PolydI:dC in a final volume of 200 µl. The beads were washed with a low salt washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% NP-40, 1 mM EDTA and 75 mM KCl) and eluted with 30 µl of SDS 0.1%. The proteins were loaded on a SDS-PAGE (12%) and migrated at 100 V for 1 h followed by silver nitrate staining or western blot analysis. For the silver nitrate gel, bands of interest were excised and analyzed by mass spectrometry (LC-MS/MS) at the Genome Québec Innovation Centre Proteomics Platform (Montreal, Qc, Canada) for protein identification.

2.5.5 Western blot

Protein extracts were eluted from the streptavidin–oligo complex, heated for 10 min at 70 °C and loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. The gel was subjected to electrophoresis for 1 h at 100 V and then transferred by electroblotting to a polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore, Bedford, MA) membrane for 45 min at 300 mA. Membranes were blocked for 1 h at room temperature with blocking buffer (PBS containing 0.2% Tween 20 and 5% skim milk powder) and incubated overnight at 4 °C with anti-mouse Parp-1 (1:1000), anti-mouse BUB-3 (1:1000; BD Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario), anti-mouse APEX-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), anti-rabbit Kif4 (1:500; Imegenex CEDERLANE Laboratories, Hornby, Ontario), anti-rabbit ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danver, MA) or anti-rabbit phospho-ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling Technology) polyclonal antibodies in the blocking buffer. Subsequently, the blots were incubated at room temperature with a secondary horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibody (1:5000; GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK) in the blocking buffer. The blots were developed using the enhanced chemiluminescence method with Kodak X-Omat films (Perkin Elmer) with X-ray film.

2.5.6 Semi-quantitative RT-PCR and siRNA transfections

Total RNA was isolated from cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario). RNA was reverse-transcribed using Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The reverse transcriptase products (20 ng) were used for amplification of apoD, HnRNP-U, Parp-1, BUB-3, Kif4, Ifi204, APEX-1 or GAPDH genes using specific primers shown in Table 2.2. The ratio obtained from sparse cultures at day 0 (D0) was given an arbitrary value of one. All reactions were done in triplicate. For the siRNA experiments, only 5 ng of the reverse transcriptase products were used. Two pre-designed siRNA were used per gene: (HRNPU: Mm_Hnrpu_1 HP siRNA or Mm_Hnrpu_5 HP siRNA; Parp-1: Mm_Parp1_3 HP siRNA or Mm_Parp1_4 HP siRNA; Qiagen) and negative controls siRNAs (Allstar negative control, Qiagen) were included in each experiment. All transfections were done twice in triplicate.

2.5.7 Luciferase assays

The cDNA of Parp-1, HnRNP-U, Ifi204, BUB-3 and APEX-1 were cloned in pcDNA3.1A expression vector (Invitrogen, Burlington, Ontario). Mutants of APEX-1 and Parp-1 were created by PCR directed mutagenesis using specific primers listed in Table 2.2. The mutants of APEX-1 were named *C64A/C92A*, *K5R/K7R*, *D218A* and Parp-1 lacking its catalytic domain: *del-Parp-1*. The mutated cDNA were cloned in pcDNA 3.1A in fusion with myc tag. Each plasmid was transiently co-transfected in NIH/3T3 cells in the presence of Polyfect (Qiagen) as recommended by the manufacturer, with a vector containing the apoD promoter upstream of the luciferase reporter gene (-558/-4-apoD-Luc). Twenty-four hours later, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline and maintained in a medium supplemented with 10 or 0.5% serum. Transfected cells were lysed 48 h later and luciferase activity was measured with the Dynex MLX microplate luminometer (MLX Dynex Technologies, Chantilly, VA) as already described (Do Carmo et al., 2002). Each sample was co-transfected with the β -gal-expressing vector for normalization (pRSV β -GAL). The β -galactosidase activity was measured using the Galacto-Light™ kit (Applied Biosystems, Bedford, MS) according to manufacturer's suggestions. Luciferase activity is presented in Relative Light Units (RLU) and represents the calculated mean \pm SD of nine transfected samples normalized by the measured β -galactosidase activity.

2.5.8 Statistical analysis

Statistical significance of the experiments was evaluated using an unpaired Student's *t*-test. Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

2.6 RESULTS

2.6.1 Purification and identification of nuclear factors binding the apoD promoter

To isolate the nuclear factors that bind to the apoD promoter, nuclear extracts from NIH/3T3 cells cultured under normal (10% serum; NE+) and serum-starved (0.5% serum; NE-) conditions were incubated with a biotinylated oligonucleotide linked to streptavidin beads. This oligonucleotide contained the SRE1 with a CArG-Box core, as well as the EBS and the GRE sites of the apoD promoter, shown in Table 2.1 and named SRE1-EBS-GRE herein. The proteins were eluted from the streptavidin-oligo complex and visualized by SDS-PAGE and silver staining (Fig. 2.1A). Bands were selected for mass spectrometry analysis based on their stronger intensity in NE (NE+, NE-) compared to those obtained from streptavidin beads without biotinylated oligonucleotide used as negative controls (CTRL+, CTRL-). The corresponding bands in the negative controls were also analyzed in order to eliminate false-negatives. Several nuclear proteins were identified by correlating the mass of their tryptic peptides with the theoretic values found in NCBI database through the Mascot server (www.matrixscience.com) and listed in Fig. 2.1B.

Five of these proteins were known to interact directly or indirectly with regulatory elements in the promoter of several genes and to modulate their expression, notably, *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (HnRNP)-U (Gao et al., 2005) and HnRNP-A/B also known as *CArG-box Binding Factor A* (CBF-A) (Kamada and Miwa, 1992; Mikheev et al., 2000), *Poly(ADP-ribose) polymerase-1* (Parp-1) (Kraus, 2008), *Interferon-inducible protein 204* (Ifi204) (Liu et al., 2005) and *Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease-1* (APEX-1) (Bhakat et al., 2003; Izumi et al., 1996). *Kinesin family member 4* (Kif4) and *Budding Uninhibited by Benzimidazole* (BUB)-3 were also considered because of their role in cellular proliferation and their interaction with Parp-1 (Midorikawa et al., 2006; Saxena et al., 2002). As shown in Fig. 2.1A, CBF-A, BUB-3 and APEX-1 were purified in both normal and growth arrest conditions. In growth conditions, the two known isoforms of CBF-A (p37 & p42) (Dean et al., 2002) were co-purified (lane 1; bands 5 and 7) in contrast to growth arrest conditions where only the p42 isoform was purified (lane 3; band 6). HnRNP-U, Parp-1

(band 2), Ifi204 (band 3), Septin 9 and *Kinesin family member C1* (KifC1) (band 4) were exclusively present in growth arrest conditions while Kif4 (band 1) only in normal growth conditions. Several other band differences were observed but the protein concentration was under the mass spectrometry limit of detection.

2.6.2 PARP-1, HnRNP-U, Kif4, BUB-3 and APEX1 bind to the apoD promoter in vitro

In order to confirm the binding specificity of the selected proteins on the apoD promoter, we performed an electrophoretic mobility supershift assay (EMSA) using commercially available antibodies against these proteins. The same oligonucleotide as that used above for the biotin-streptavidin purification (Table 2.1) was radiolabeled and incubated with nuclear extracts from serum-starved NIH/3T3 cells. As shown in Fig. 2.2A, we observed several protein-DNA complexes (CTRL+) compared to the negative control (CTRL-). In the presence of an antibody directed against HnRNP-U, the complex corresponding to band II disappeared (indicated with an asterisk). Competition assay using cold (SRE1-EBS-GRE) and unrelated (UNR) oligonucleotides in 25 and 50 molar excess demonstrated the specificity of formed complexes. In contrast, for Parp-1, 50 µg of nuclear extract were required in order to detect the supershift. Four bands could be detected but the two major (bands II and III) disappeared in favor of a supershifted band (Fig. 2.2A, arrow). Although, the binding specificity of these complexes was not verified in this experiment with cold oligonucleotide excess, the intensity of band IV was increased in the presence of 0.25 µg of Parp-1 specific antibodies and reduced progressively with increasing amounts of antibodies (0.5 to 2 µg).

The antibodies directed against Kif4, BUB-3 and APEX-1 failed to supershift the DNA-complexes observed (data not shown). However, in a pull-down assay using biotinylated oligonucleotides containing regulatory consensus sequences that were either intact or mutated or deleted (Table 2.1), we observed by western blot that Kif4 was preferentially bound to the SRE1 in growth conditions (Fig. 2.2B). In growth arrest conditions, BUB-3 did not bind the SRE1-mEBS-mGRE but was specifically bound to the mSRE1-EBS-GRE and the EBS-GRE where the SRE1 had been mutated or deleted, respectively. APEX-1 could bind both the SRE1-mEBS-mGRE and the mSRE1-EBS-GRE but not the EBS-GRE.

2.6.3 mRNA expression of nuclear factors in growth-arrested NIH/3T3 cells

We next analyzed the mRNA expression of these nuclear factors in NIH/3T3 fibroblasts to determine if they were also modulated by growth arrest as the apoD gene. Cells were collected in growth conditions and at different times after serum deprivation. Using specific primers for the different genes (Table 2.2), their expression level was analyzed by semi-quantitative RT-PCR and normalized to that of GAPDH gene expression. As expected, apoD mRNA expression was significantly induced in serum starvation conditions (Fig. 2.3). Expression levels of Parp-1 were also induced by 2.1-fold after 1 day of serum starvation and reached a peak at day 2 with a 3-fold induction to finally decrease until day 5. This induction was even stronger by Northern analysis (up to 9 fold at day 2). Ifi204 and APEX-1 were also induced after 2 days of serum starvation by respectively 2.8 and 1.8 fold. In contrast, Kif4 mRNA expression was downregulated after 2 days of serum starvation which is consistent with the fact that Kif4 was only detected on the apoD promoter in growth conditions (Fig. 2.1A). In addition, HnRNP-U and BUB-3 were not modulated under serum starvation and seem ubiquitous.

2.6.4 Transactivation of the apoD promoter

To determine if these nuclear proteins are directly involved in the modulation of apoD gene expression, the corresponding cDNAs cloned in expression vectors were transiently co-transfected in NIH/3T3 cells with a construct containing the apoD promoter upstream of the luciferase reporter gene (-558/-4-apoD-Luc) and with pRSV β GAL vector. The luciferase activity was analyzed in normal and serum-starved conditions. In growth conditions (10% serum; Fig. 2.4A: white bars), none of the proteins tested had an effect on apoD promoter activity compared to the control (empty vector). However, after 2 days of serum starvation (0.5% serum; grey bars), Parp-1, HnRNP-U, APEX-1 and Ifi204 significantly activated the apoD promoter. In contrast, BUB-3 did not transactivate the apoD promoter.

To confirm these results, we created specific mutations on APEX-1 gene on cysteines 64 and 92 which were replaced by alanine (C64A/C92A). These cysteines are known to be implicated in the redox activity of APEX-1 which modifies and modulates the activity of

several transcription factors (Fritz et al., 2003). Lysines 6 and 7, located in the nuclear localization signal motif (NLS) and known to be acetylated by p300 were replaced by arginine (*K6R/K7R*). This double mutation abrogates the redox activity of APEX-1 without affecting its nuclear localization (Jackson et al., 2005). Finally, aspartic acid 218 which is known to be important for the endonuclease and DNA-binding activities (Fritz, 2000) was replaced by alanine (*D218A*). As shown in Fig. 2.4A, all these mutants were unable to transactivate the apoD promoter in growth arrest conditions in contrast with the wild type APEX-1. Interestingly, mutants *C64A/C92A* and *K6R/K7R* induced the proliferation of NIH/3T3 cells cultured in condition of serum starvation compare to the wild-type APEX-1 or the control (CTRL-; empty vector) where the cells were maintained in a growth arrest state (Supplemental Fig. 2.1). In addition, the Parp-1 deletion mutant lacking its catalytic domain (del-Parp-1) could no longer transactivate the apoD promoter indicating the importance of the catalytic function in the apoD promoter regulation. Furthermore, we tested the role of Parp-1 and HnRNP-U on the apoD expression using a siRNA approach. The pre-designed siRNAs used to block either HnRNP-U or Parp-1 inhibited their target gene expression by more than 80% up to 4 days under growth arrest (grey bars; Fig. 4B) and efficiently and specifically blocked apoD expression (grey bars; Fig. 2.4C).

2.6.5 Effect of Parp-1 and MEK1/2 inhibitors on the apoD gene expression

To further investigate the role played by the catalytic activity of Parp-1 in the regulation of the apoD promoter during growth arrest, we used 3-Amino-Benzamide (3-ABA), a specific inhibitor of Parp-1. This inhibitor blocks the binding of NAD^+ to the catalytic domain of Parp-1. This binding is crucial for the transfer of ADP-ribose unit on nuclear proteins mediated by Parp-1 (Griffin et al., 1995). As expected, the inhibition of Parp-1 catalytic activity with 3-ABA at 10 mM completely abolished the stimulating effect of Parp-1 on the apoD gene expression in growth-arrested cells (Fig. 2.5A). This result was consistent with those obtained with the deletional mutant del-Parp-1 transfection experiment and the siRNA assay (Fig. 2.4A and C).

Furthermore, considering the important role played by the MEK/ERK pathway in cellular proliferation and differentiation as well as the interplay between ERK and Parp-1, which modulates their respective catalytic activity (Cohen-Armon, 2007; Cohen-Armon et al., 2007), we also analyzed the effect of a MEK1/2 inhibitor (U0126 at 10 μ M) on the apoD gene regulation. Interestingly, the inhibition of MEK1/2, which phosphorylate ERK1/2, significantly reduced the apoD gene expression under growth arrest conditions (Fig. 2.5B). Complete inhibition of ERK1/2 phosphorylation in presence of U0126 was verified by western blot analysis (results not shown). Consistent with this result, upregulation of phosphorylated ERK1/2 was detected as early as 5 min after serum starvation without inhibitor, reached a peak at 15 min and decreased after 30 min (Fig. 2.5C). Surprisingly, at 24 h post serum starvation, ERK1/2 were again phosphorylated. Moreover, in the presence of Parp-1 inhibitor, activation of ERK2, but not ERK1, is maintained after 15 min for up to 2 h (Fig. 2.5D). Subsequently, ERK2 phosphorylation was completely inhibited after 2 h in the presence of Parp-1 inhibitor which is consistent with the apoD gene downregulation observed in Fig. 2.5A and B.

2.7 DISCUSSION

The apoD promoter was previously characterized and its complexity is reflected by the numerous cis elements located within its promoter (Do Carmo et al., 2002; Lambert et al., 1993). Using a biotinylated oligonucleotide containing the SRE1, EBS and GRE elements of the apoD promoter, we were able to purify and identify several nuclear proteins by mass spectrometry analysis. Among these proteins, HnRNP-U and CBF-A (Fig. 2.1A), which belong to the Heterogeneous nuclear ribonucleo-protein family, are also known to interact with elements in the promoter of several genes and to regulate their expression. Indeed, HnRNP-U is known as a transcriptional activator of Kruppel-like factor 2 gene (Ahmad and Lingrel, 2005) and of Osteopontin gene expression, which is also modulated by CBF-A (Gao et al., 2005). CBF-A is also involved in the regulation of the Ha-ras gene expression (Mikheev et al., 2000). The mRNA binding ability of these two proteins led us to speculate that they could be recruited at the promoter level and play a role in both the apoD mRNA expression and processing, in this context of growth arrest. All these different crucial roles of HnRNP-U may explain its ubiquitous gene expression profile in growth-arrested NIH/3T3 cells (Fig. 2.3). Binding of HnRNP-U to the promoter was further demonstrated by EMSA (Fig. 2.2A). The addition of HnRNP-U antibodies specifically reduced the complex intensity. This interaction with the SRE1-EBS-GRE, whether direct or indirect, is in agreement with previous reports showing that HnRNP-U can play a role in gene regulation via its interaction with the GRE site located in the promoter of the tryptophan oxygenase gene (Kaneoka et al., 2009) and therefore suggests that HnRNP-U might interact with the apoD promoter through the GRE binding site.

Parp-1 is an abundant nuclear protein with a poly(ADP-ribosyl)-ation catalytic activity which uses NAD^+ as substrate to modify several nuclear proteins, such as transcription factors thus affecting their functions (D'Amours et al., 1999; Kraus, 2008). Although, several studies have shown its implications in DNA repair pathways, its DNA-binding and catalytic activities are also implicated in transcription regulation (D'Amours et al., 1999; Kraus, 2008). Despite the fact that Parp-1 is reported as a ubiquitous protein, we found that its gene

expression is up-regulated in growth-arrested NIH/3T3 cells and we clearly demonstrated its binding to the apoD promoter, highlighting its importance in this stress condition. We were able to obtain a supershift by EMSA upon addition of a specific antibody coupled with the disappearance with the major bands II and III. Bands I and IV were very faint and detectable only when 50 μ g of extracts were used. Both bands appeared more abundant in growth arrest conditions and seem specific since they disappeared in the presence of Parp-1 antibodies (Fig. 2.2A).

In agreement with our results, Parp-1 can be activated by its binding to conformational or non-B DNA structures such as cruciforms or hairpins (Lonskaya et al., 2005; Sastry and Kun, 1990). More importantly, cruciforms can be formed within a sequence that contains inverted repeats with the appearance of duplex arms. The SRE was already reported to be able to form cruciforms which resemble the Holliday junction (Bacolla and Wells, 2004). Moreover, several studies demonstrated the interaction of Parp-1 with DNA in a sequence-specific manner. Tapia-Paez and collaborators (Tapia-Paez et al., 2008) reported the binding of Parp-1 to a SRE-CArG-like element. Parp-1 was also shown to bind a recently named Parp-1-binding element (PBE) (Okada et al., 2008) whose consensus sequence resembles that of the GRE.

We were not able to confirm binding by EMSA for the other selected proteins for which specific antibodies were commercially available most likely because the recognized epitope is hidden in the protein native form. However, using the biotin pull-down approach followed by western blot analysis, we confirmed that these proteins effectively bind the region of the promoter containing the SRE1, EBS and GRE sites (Fig. 2.2B). Obviously, BUB-3 does not recognize the SRE1 since the protein still binds an oligo lacking the SRE1 or an oligo in which the SRE1 was mutated. It is worth mentioning that, by mutating the EBS, we also mutated the GRE as well as the SRE1 because these sites are superimposed (see Table 2.1). Moreover, BUB-3 did not modulate the apoD promoter (Fig. 4A) and the gene was not activated under growth arrest (Fig. 2.3).

Based on our results, Kif4 binds the SRE1 most probably through its CArG-box core since it only binds the intact SRE1 (Fig. 2.2B) and as already mentioned above, most of the mutated EBS consensus sequence is included within the inverted repeat of the SRE1. Kif4 is a member of the kinesin superfamily of proteins known to transport cargos of macromolecules along the microtubules of cells, such as membrane organelles, protein complexes and mRNAs (Hirokawa and Takemura, 2005; Midorikawa et al., 2006). The Kif4 nuclear localization was shown to be regulated by its interaction with Parp-1 in juvenile neurons. In addition, Kif4 can repress Parp-1 enzymatic activity in the nucleus of NIH/3T3 cells in normal culture conditions (Midorikawa et al., 2006). Thus, the apoD gene expression could be modulated by the interaction of these two proteins. In our study, Parp-1 could not be purified in normal growth conditions suggesting that the possible interaction of Parp-1 and Kif4 in NIH/3T3 cells, reported by Midorikawa and collaborators (2006), may inhibit Parp-1 binding on the apoD promoter. Therefore, the presence of Parp-1 on the apoD promoter in growth arrest conditions may be favored by both the down- and upregulation in gene expression of Kif4 and Parp-1, respectively (Fig. 2.3).

In contrast, APEX-1 binds the promoter but binding persists despite the mutations of each consensus sequence (Fig. 2.2B). However, the deletion of the SRE1 abolished the binding. This implies that APEX-1 probably binds the apoD promoter through a greater affinity for the mutated sequences or through the interaction with other proteins, such as Parp-1, that bind either the SRE1 or the EBS-GRE sites. APEX-1 is a multifunctional protein implicated in DNA repair through the base-excision repair (BER) pathway, where Parp-1 was also shown to be involved but more importantly, APEX-1 is well known for its role in transcription regulation through a redox activity. Indeed, the redox activity of APE1 was shown to modify and activate several stress-inducible transcription factors such as AP-1, NF- κ B, p53, Egr-1, CREB, ATF and HIF-1 α (Fritz et al., 2003; Tell et al., 2009). The fact that APEX-1 gene expression was found induced in growth arrest conditions may also indicate its importance in such stress conditions (Fig. 2.1B). Also, APEX-1 was shown to be induced in several stresses such as oxidative conditions, cancers (Fritz et al., 2003) and several neurodegenerative disorders (Tell et al., 2009). It is interesting to note that such stresses

including H_2O_2 and UV induce apoD gene expression as well as the catalytic activity of Parp-1 (Do Carmo et al., 2008; Do Carmo et al., 2007; Ganfornina et al., 2008). Therefore, it would be of interest to investigate if Parp-1 and APEX-1 also modulate the apoD gene expression under these conditions and will definitely clarify the mechanism of regulation of the gene. Indeed, apoD is considered as a stress protein, and we demonstrated that it plays a protective effect for neurons of mice treated with paraquat (Ganfornina et al., 2008). A similar protection against oxidative stress was observed in *Drosophila* and plants (Charron et al., 2008; Ganfornina et al., 2008). Protection was also observed in mice infected with OC43, a coronavirus that induces brain inflammation and neurodegeneration (Do Carmo et al., 2008).

Ifi204 is a 72-kDa phosphoprotein and a member of the interferon-inducible p200 (Ifi-200) family of proteins induced by interferons (IFNs) (Asefa et al., 2004). Due to the lack of specific antibodies against Ifi204, it was not possible to confirm its binding to the apoD promoter by EMSA. However, the protein was clearly identified with a high score in the streptavidine beads technique in extracts from growth arrest conditions (Fig. 2.1B). More importantly, Ifi204 expression was induced under serum starvation (Fig. 2.3). These results are consistent with the known interaction of Ifi204 and the Retinoblastoma protein (pRb) which both inhibit proliferation. Also, mutations in Ifi204 confer malignant transformation properties in NIH/3T3 cells (Asefa et al., 2004; De Andrea et al., 2002).

In the transactivation assay, we showed that Parp-1, HnRNP-U, APEX-1 and Ifi204 had a positive effect on the apoD promoter in growth arrest conditions only (Fig. 2.4A). The positive effect of Parp-1 and HnRNP-U was also confirmed by the knock down of their expression with specific siRNA. Their inhibition totally abolished the apoD gene induction under serum starvation conditions (Fig. 2.4C). Moreover, we further demonstrated the importance of Parp-1 and APEX-1 catalytic activities in the induction of apoD gene expression in growth-arrested cells. These results were observed either by deleting the C-terminal portion containing the catalytic domain of Parp-1 (Fig. 2.4A) or by inhibiting its catalytic activity with a specific inhibitor 3-ABA (Fig. 2.5A). For APEX-1, both its redox

and DNA-binding activities were necessary to transactivate the apoD promoter and we demonstrate a link between APEX-1 redox activity and the cell cycle regulation since inhibition of APEX-1 activity promotes cell proliferation under serum starvation (Supplemental Fig. 2.1). This is consistent with the strong relation between the redox cycle and cell cycle regulation (Menon and Goswami, 2007; Sarsour et al., 2009).

We also found that the inhibition of MEK1/2 blocks apoD gene induction by growth-arrest after 2 days showing the importance of this pathway in the regulation of apoD gene expression. This is surprising since ERK1/2 activation is essential for cell cycle progression from G1- to S-phase by downregulating several antiproliferative genes (Meloche and Pouyssegur, 2007; Yamamoto et al., 2006). However, ERK1, but not ERK2, expression in fibroblasts inhibits oncogenic Ras-mediated proliferation, colony formation as well as tumor production in nude mice (Vantaggiato et al., 2006). More importantly, the B-Raf isoforms can induce cell-cycle arrest in NIH/3T3 cells (McCubrey et al., 2007). In this study, we showed biphasic ERK1/2 activation in time in growth-arrested NIH/3T3 cells, reaching a peak at 15 min, decreasing after 30 min and activated again 24 h later (Fig 2.5C). In addition, ERK2 remains phosphorylated for up to 2 h in the presence of Parp-1 inhibitor which blocks apoD expression (Fig. 2.5D). This result implies that ERK1/2 activation is necessary for apoD gene induction. This regulation of ERK1/2 phosphorylation in growth arrest conditions could be mediated by Parp-1 activity. Further investigations are necessary to verify if ERK1/2 are effectively ADP-(ribosyl)ated in stress conditions and also to determine if ERK1/2 kinase activity is directly involved in the regulation of the nuclear factors identified herein.

In conclusion, we identified several proteins that bind the apoD promoter through the SRE1, EBS and GRE elements and regulate its gene expression in growth arrest conditions. Our results also highlight the implication of the MEK/ERK pathway in the apoD regulation, itself modulated by Parp-1 catalytic activity. They demonstrate a central role played by Parp-1 and APEX-1, both through their binding to the apoD promoter and their catalytic activity during this process.

2.8 ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge support from the Canadian Institutes for Health Research to ER (Grant MOP-15677). SDC was supported by FRSQ and NSERC studentships.

Table 2.2. Primers used for gene expression analysis by RT-PCR and mutagenesis.

Gene	Primers sequence forward	Primers sequence reverse
Primers for RT-PCR		
ApoD	5'-CCACCGGCACCCTACTGGATC-3'	5'-CGGGCAGTTCGCTTGTTGATCTGT-3'
HnRNP-U	5'-GAAGAAGAAGACGAACACTTCGA-3'	5'-AAAATTTTCGCTTCTTACGGGCAG-3'
Parp-1	5'-ATGGCGGAGGCCCTCGGAG-AG-3'	5'-TCTGGATCCACCATCTTCTTGGACAG-3'
BUB-3	5'-ATGACCGGTTCGAACGAATTCAA-3'	5'-TTACGTGGACTTGGGCTTTGTTT-3'
Kif-4	5'-ATGAAAGAAGAGGTGAAGGGGA-3'	5'-GTAGCTTTCTCAGAGATGAAC-3'
Ifi204	5'-ATGGTGAATGAATACAAGAGAATTG-3'	5'-TCCAGTGATGTTTCTCCTCTTA-3'
APEX-1	5'-ATGCCAAAGCGGGGAAAGAAAG-3'	5'-CAACGCTGTCGGTATTCCAG-3'
GAPDH	5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACGG-3'	5'-ATGGGGGCATCGGCAGAAGG-3'
Primers for mutagenesis		
Del-Parp-1	5'-GTT AAGCTT GCAGCACGAGAAGGAGGATGGC-3' (forward)	
Del-Parp-1	5'-CAGCAGCCTCCGG TCTAGAA AGCTGCA-3' (reverse)	
APEX-1	5'-GTT AAGCTT GGGCTTTTCGTCACAGCGATGCC-3' (forward)	
APEX-1	5'-GCTTT TCTAGAC AGTGCTAGGTAAAGGGTGATG-3' (reverse)	
*C64A	5'-CCACACTCAAGATAgcCTCCTGGAATGTGG-3'	
*C92A	5'-ACCAGATATCTTGgcCCTCCAACACACCAA-3'	
*K6R/K7R	5'-GTT AAGCTT GGGCTTTTCGTCACAGCGATGCCAAAGCGGGGAagGAg-3'	
*D218A	5'-ATGAAGAAATTGcCCTCCGTAACCCCAAAG-3'	

*, amino acid mutated in APEX-1 gene; lower case letters bold, mutated nucleotide; upper case bold, restriction endonuclease site (forward, HindIII; reverse, XbaI).

2.9 FIGURE LEGENDS

Figure 2.1. Purification of nuclear proteins binding to the SRE1-EBS-GRE elements of the human apoD promoter. (A) Nuclear extracts from normal growth (10% serum: +) or growth arrest (0.5% serum: -) conditions were incubated with either the biotinylated oligonucleotide bound to streptavidin beads (NE) or streptavidin beads alone (CTRL). The bound proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE and silver staining. The numbers and arrows on the gel indicate the excised bands. (B) Mass-spectrometry analysis of the eluted bands. Nuclear factors were identified by mass spectrometry (LC-MSMS) after tryptic digestion. STD: Standard molecular weight in kDa; this experiment was done in duplicate.

Figure 2.2. Binding of HnRNP-U, PARP-1, Kif4, BUB-3 and APEX-1 to the apoD promoter. (A) Nuclear extracts from 5-day serum-starved NIH/3T3 mouse fibroblasts were used in electrophoretic mobility assay with double stranded oligonucleotides containing the SRE1-EBS-GRE of the apoD promoter. 20 μ g (HnRNP-U) and 50 μ g (Parp-1) of nuclear extracts were incubated in the presence of 0.8 ng of radiolabeled probe and different amounts of specific antibodies. Unlabeled competitor nucleotides were added at 25- and 50-fold molar excess. UNR: (unrelated) non-specific competitor; NE: nuclear extracts; (+): growth condition; (-): growth arrest condition; CTRL: negative control (probe only); Abs: specific antibodies. The asterisks represent the disappearance of the DNA-complex and the arrow the supershifted DNA-protein complex. Representative of three similar experiments. (B) Biotin pull-down assay using different probes in which sequence of specific regulatory element was mutated or deleted as indicated (Table 2.1). The eluted proteins were then analyzed by western blot using specific antibodies against Kif4, BUB-3 and APEX-1. Sequence from the IRU5Cas LTR of Cas-Br-E retrovirus was used as negative control.

Figure 2.3. Analysis of mRNA expression of nuclear factors in NIH/3T3 growth arrested cells. Semi-quantitative RT-PCR using specific primers for the indicated genes (Table 2.2). The expression of each gene tested was normalized by GAPDH expression. ($N = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). An example of one Northern analysis is presented for Parp-1.

Figure 2.4. ApoD mRNA induction in growth-arrested cells and siRNA analysis. (A) NIH/3T3 cells were co-transfected with vectors containing a luciferase reporter construct under the 5'-flanking region (-558/-4) of the apoD promoter gene, the cDNAs corresponding to the identified proteins or APEX-1 cDNA carrying mutations (C64A/C92A, K5R/K7R and D218A) and the plasmid pRSV β GAL. After transfection, cells were cultured in media with (10%; white bars) or without serum (0.5%; grey bars) for 2 days. The luciferase activity was analyzed and normalized by the β -Galactosidase activity. The empty pcDNA 3.1 expression vector was used as control. The asterisks indicate statistically significant results ($N = 9$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). Del-Parp-1 corresponds to the protein lacking its C-terminal end and its enzymatic activity. (B) NIH-3T3 cells were transiently transfected with siRNA directed against HnRNP-U and Parp-1 and exposed to serum-starved conditions for 4 days. Total RNA was extracted and analyzed by RT-PCR using specific primers for the HnRNP-U, Parp-1 gene and HPRT as control. (C) ApoD mRNA expression analyzed by RT-PCR in NIH-3T3 cells exposed to serum starved conditions for 4 days after siRNA suppression of HnRNP-U and Parp-1 genes. As negative controls, transfections with non-specific siRNA (siRNA NS) or without siRNA (-siRNA) were used.

Figure 2.5. Analysis of apoD mRNA expression in presence of Parp-1 and MEK1/2 inhibitors. NIH-3T3 cells were cultured under normal (10% serum, +) and serum starvation (0.5% serum, -) conditions for 48 h with or without Parp-1 specific inhibitor: 3-Amino-Benzamide (3-ABA, 10 mM) (A) or MEK inhibitor: U0126 (10 μ M) (B). Total RNA was extracted and the expression of apoD gene was analyzed by RT-PCR. The GAPDH gene was used as internal control. The asterisk indicates statistically significant results ($N = 4$, $***P < 0.001$). Western blots of the phosphorylation levels of ERK1/2 in NIH/3T3 cells under serum starvation at different time points (C) and in the presence of Parp-1 inhibitor (D) (representative of three similar experiments).

Figure 2.1

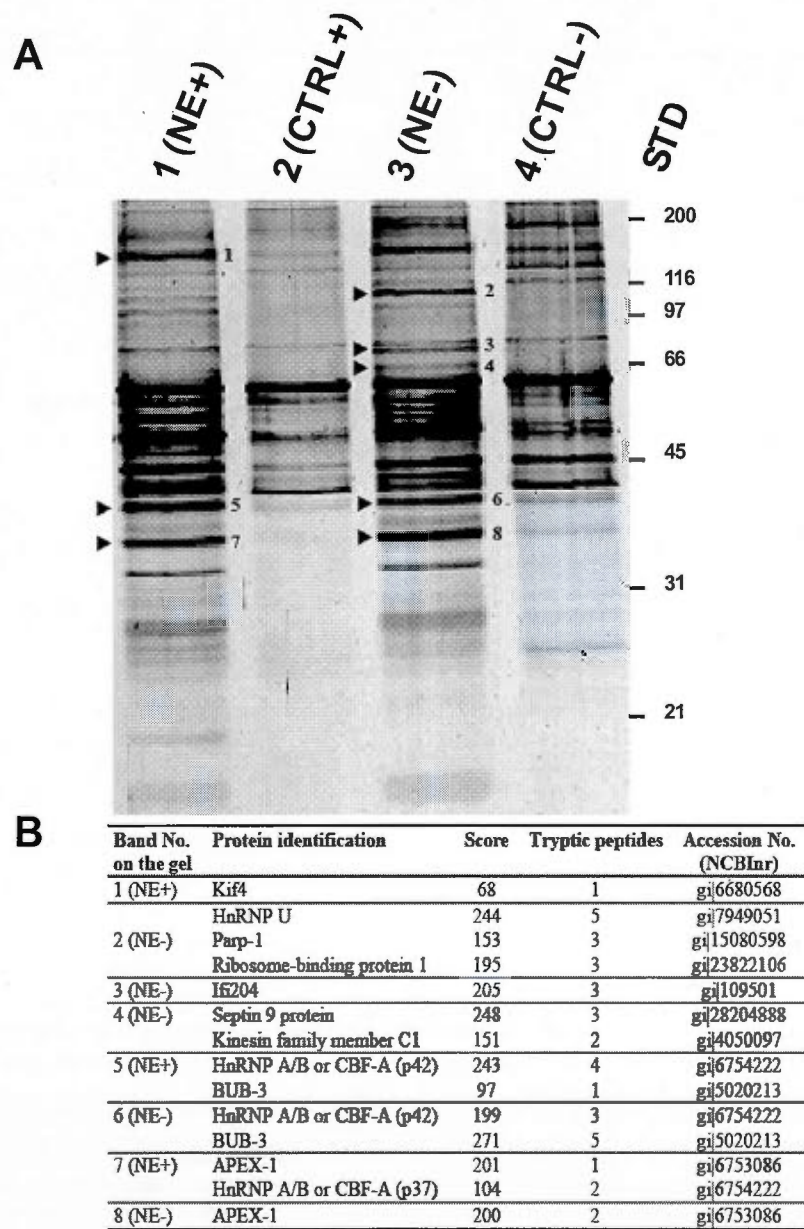


Figure 2.2

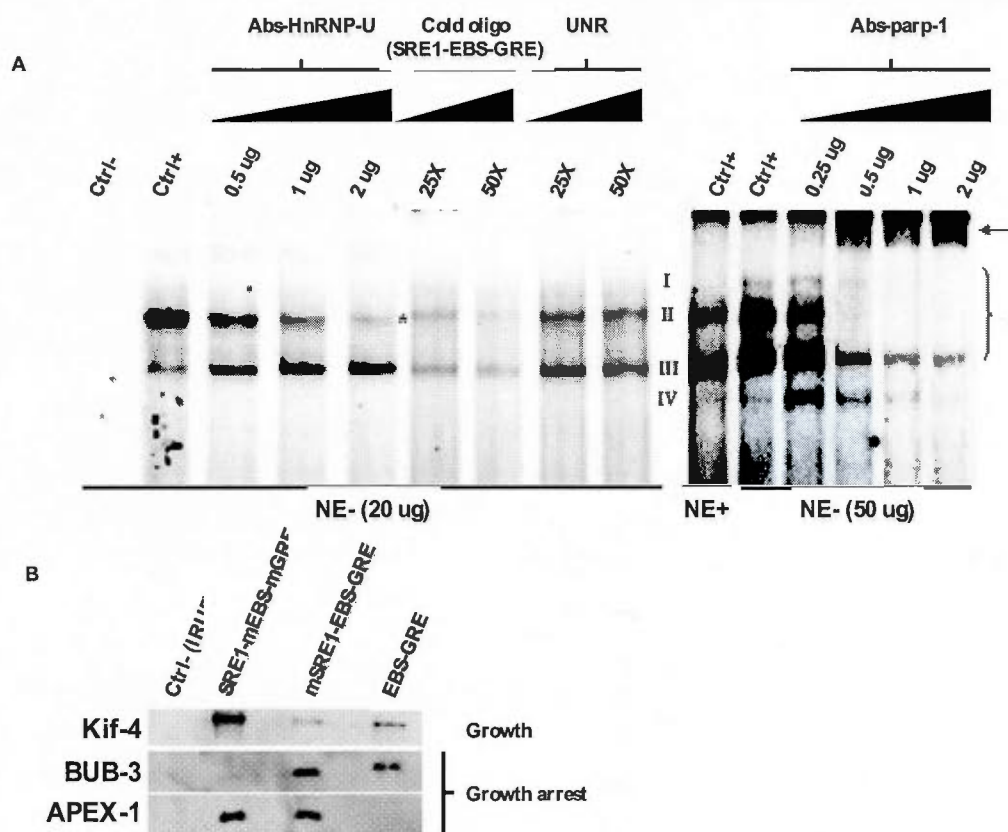


Figure 2.3

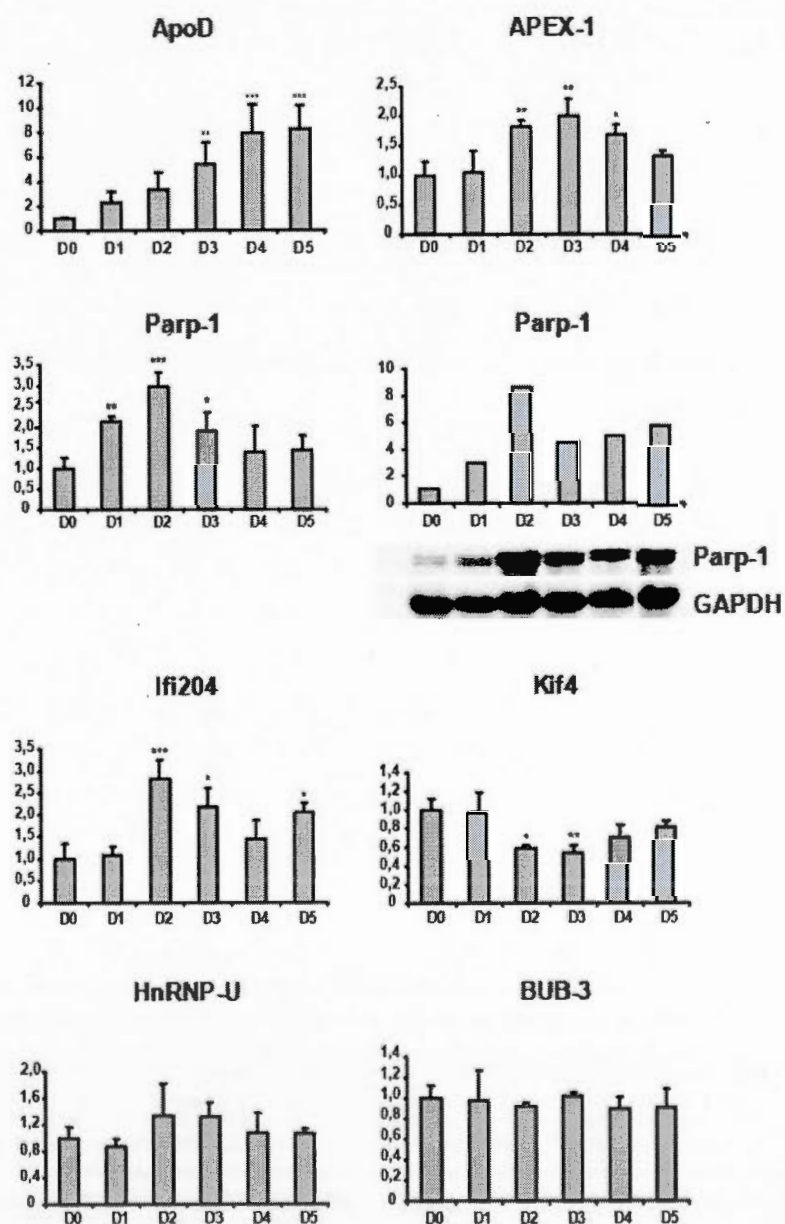


Figure 2.4

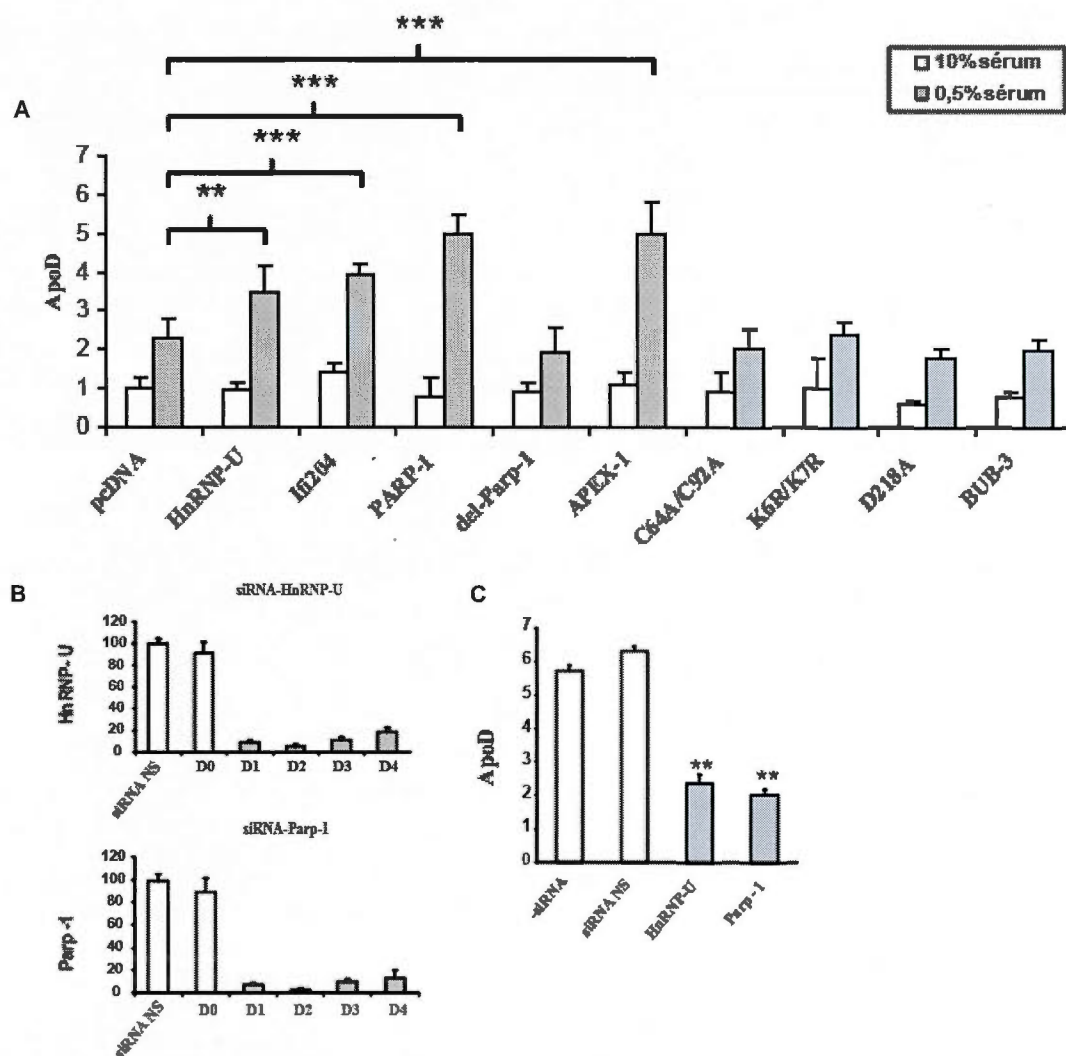
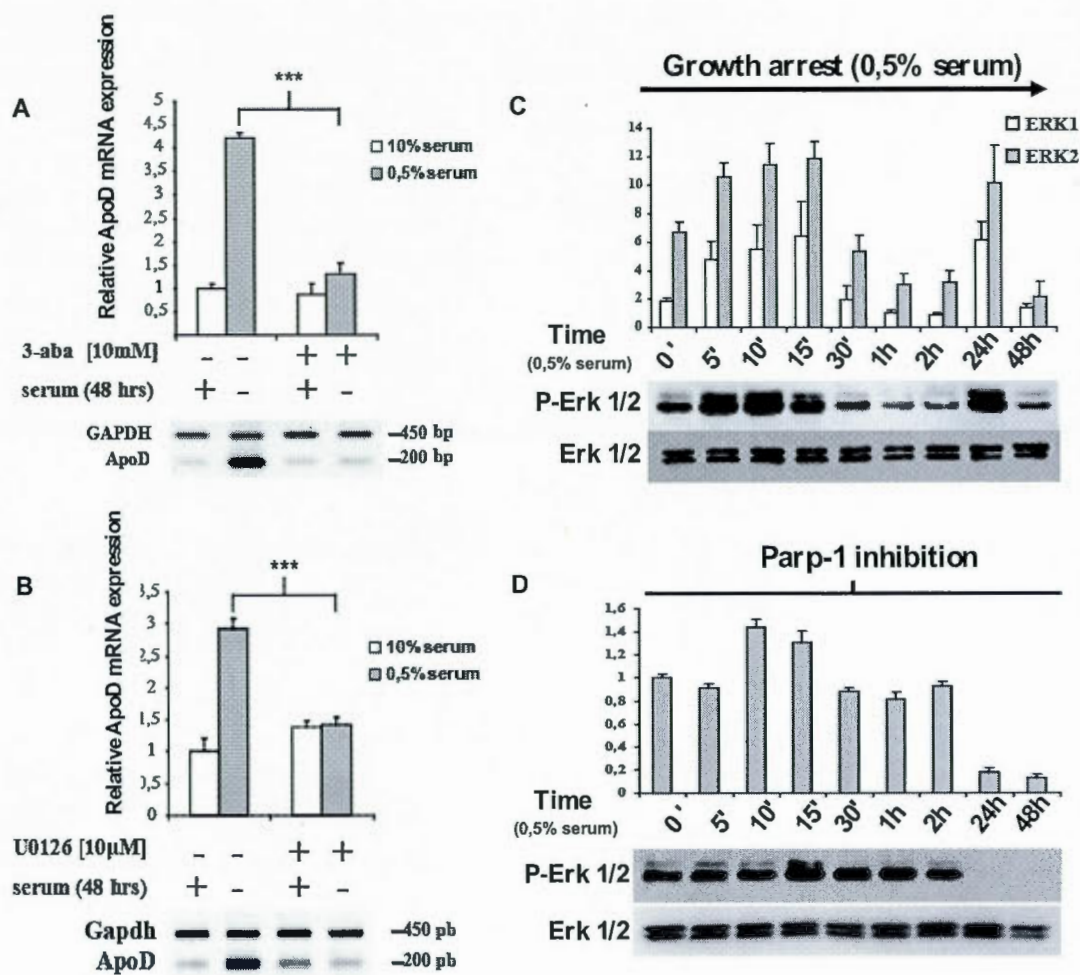
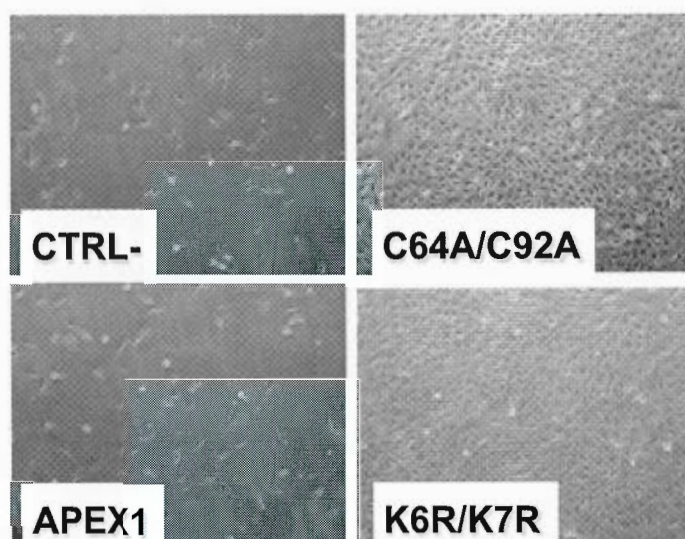


Figure 2.5



2.10 SUPPLEMENTAL MATERIAL

Figure S2.1. Mutation in the catalytic domain of APEX-1 stimulates proliferation during serum starvation. NIH/3T3 cells were transfected with vectors containing the APEX-1 cDNA or mutants C64A/C92A and K5R/K7R. The control (CTRL-) corresponds to empty pcDNA 3.1A vector. After transfection, cells were cultured in media without serum (0.5%) for 2 days. Representative of five similar experiments.

Figure S2.1

CHAPITRE III

LISTE DES PROTÉINES NUCLÉAIRES EXTRAITS DE CERVEAUX DE SOURIS
SAINES OU INFECTÉES AVEC LE CORONAVIRUS HUMAIN OC43 POUVANT
INTERAGIR AVEC LE PROMOTEUR HUMAIN D'*APOD*

3.1 AVANT-PROPOS

Ce chapitre présente les protéines purifiées et identifiées pouvant interagir avec le promoteur humain d'*APOD*. Ces protéines nucléaires ont été extraites à partir de cerveaux de souris présentant des symptômes de neurodégénérescence causés par un coronavirus humain (OC43). La technique de purification et de séquençage par spectrométrie de masse sera décrite dans le chapitre IV. Toutes les protéines présentées dans la Table 3.1 ont été analysées en rapport avec la littérature (pubmed) afin de démontrer leur lien ou leur rôle en tant que facteur de transcription. Cette analyse a aussi été complémentée à l'aide d'une banque de données présentant une liste exhaustive des facteurs de transcription connus chez la souris (http://genome.gsc.riken.jp/TFdb/tf_list.html). Étant donné le nombre élevé de protéines identifiées, seulement quelques-unes d'entre elles seront décrites dans ce chapitre. Une attention particulière sera accordée aux protéines nucléaires dont leur rôle en tant que facteur de transcription est moins bien connu dans la littérature. Effectivement, deux d'entre elles, l'apolipoprotéine E et la protéine non-structurale du coronavirus (Ns2) ont été caractérisées afin de déterminer leur rôle dans la régulation du gène d'*APOD* et dont les résultats obtenus font l'objet des chapitres IV et V. Bien que ce chapitre ne soit pas présenté sous forme d'article, la liste de ces protéines permettra de faire une banque de donnée accessible via un site internet.

3.2 RÉSULTAT ET DISCUSSION

Sachant que l'expression génique d'*ApoD* est augmentée dans plusieurs régions du cerveau de souris infectées par le coronavirus humain OC43, nous avons purifié et identifié les protéines pouvant interagir avec le promoteur d'*APOD*. Cette étude permettra éventuellement de mieux comprendre les mécanismes de régulation du gène encodant l'*APOD* dans des situations de stress neurologiques. Brièvement, la région -816 à + 64 du promoteur humain d'*APOD* a été divisée en six fragments d'ADN chevauchants d'environ 200pb (voir Figure 4.1) qui ont été utilisés comme appâts lors de la purification de protéines nucléaires provenant de cortex de souris saines (contrôle; ctrl) ou infectées par le virus OC43. Nous avons aussi choisi d'omettre un contrôle négatif, c'est-à-dire l'emploi d'un fragment d'ADN non spécifique n'ayant aucune homologie de séquence avec le promoteur d'*APOD*, puisque ces six fragments contiennent des éléments de réponses régulateurs différents. Ils peuvent donc être comparés l'un par rapport à l'autre, notamment pour les fragments éloignés. De plus, en utilisant des fragments chevauchants, cela permet en quelque sorte de dupliquer cette expérience pour les régions qui sont communes. Les protéines retrouvées de façon ubiquiste sur tous les fragments et dans les deux conditions pourront être considérées comme des protéines non spécifiques. Toutefois, un facteur de transcription connu pour lier un élément de réponse en particulier peut lier l'ADN d'une manière non spécifique dans des conditions *in vitro*. Effectivement, l'ADN « nu » étant débarrassé de protéines structurales telles que les protéines chaperonnes et les histones formant les nucléosomes, les facteurs nucléaires peuvent alors lier des régions qui seraient inaccessibles *in vivo*. C'est pour cela que nous avons considéré toutes les protéines purifiées dont plusieurs centaines ont été identifiées par spectrométrie de masse et répertoriées dans la Table 3.1. En utilisant de longs fragments d'ADN, il n'est pas étonnant d'obtenir un si grand nombre de protéines.

3.2.1 Facteurs de transcription généraux

Parmi ces protéines, plusieurs sont des facteurs de transcription bien documentés dans la littérature et indexés dans la section 1 : « *Nuclear factors with known transcription or DNA binding activities* ». Les 20 premières protéines identifiées et mises en italique sont des

facteurs de transcription généraux, tels que le facteur TFIIB ou le « *RNA polymerase II-associated factor 1 homolog* » (Paf1). Les autres protéines de cette section sont soit des activateurs ou répresseurs de la transcription soit des protéines constitutives impliquées dans divers processus cellulaires. D'autres encore sont connues pour être des co-activateurs ou co-répresseurs. Plusieurs protéines identifiées sont activées lors de stress inflammatoires ou oxydatifs en lien avec notre modèle de neurodégénérescence. Nous montrons que les facteurs de transcription Ccar1, Pin1, β -catenin, Daxx, Max, Gsn, Flii, Bin1, Stat1, Nr2f1, Pura/b, Npm1, Pcbp1/2, Ptbp1/2, Frap1, Pml, Clqbp et Stxbp1 entre autres lient différentes régions du promoteur (section 1).

3.2.2 La protéine Ccar1

La protéine Ccar1 (« *Cell division cycle and apoptosis regulator 1* ») est une phosphoprotéine périnucléaire et dont l'expression génique est induite par déprivation de sérum dans des carcinomes de sein humains (Rishi et al., 2003; Zhang et al., 2007). Elle est retrouvée majoritairement sur le promoteur d'*APOD* dans le cortex de souris infectées par le virus OC43, à l'exception de la région 4 où un seul peptide tryptique a été repêché et absente dans la région 3. Ccar1 est un facteur de transcription interagissant avec des complexes médiateurs impliqués dans le recrutement de l'ARN polymérase II aux promoteurs des gènes. Ces médiateurs sont eux-mêmes recrutés par les récepteurs nucléaires et il a été démontré que Ccar1 agit en tant que coactivateur de ces récepteurs nucléaires tels que les récepteurs aux estrogènes et aux glucocorticoïdes (Kim et al., 2008a) et dont leurs sites de liaison à l'ADN respectifs sont le ERE et le GRE qui sont aussi retrouvés sur le promoteur d'*APOD*. La protéine Ccar1 est aussi un coactivateur du facteur de transcription p53 et est considérée comme étant un suppresseur de tumeur dans les cancers du sein (Zhang et al., 2007). En interagissant avec les protéines 14-3-3 et β -catenin, aussi identifiées sur le promoteur d'*APOD*, Ccar1 inhiberait l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire incluant c-Myc et la cycline B1 et induirait l'apoptose dans les cellules cancéreuses en activant la protéine p38 MAPK (Ou et al., 2009; Rishi et al., 2003; Rishi et al., 2006).

3.2.3 La protéine Pin1

Un autre facteur nucléaire repêché sur le promoteur d'*APOD* est la protéine Pin1 (« *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1* ») connue dans la littérature comme facteur de transcription impliqué dans les cancers et dans les maladies neurodégénératives, notamment dans la maladie d'Alzheimer (Lee et al., 2011). Son activité enzymatique modifierait les protéines phosphorylées. Plus précisément, Pin1 isomériser les liens peptidiques Ser/Thr-Pro suite à une phosphorylation. Sachant que la phosphorylation de protéines sur les résidus sérines ou thréonines suivis d'une proline (Ser/Thr-Pro) joue un rôle central dans plusieurs processus cellulaires, il apparaît évident que cette protéine est importante tant en condition physiologique que pathologique. Brièvement, les mécanismes de régulation de cette protéine dans les situations pathologiques sont dus au fait que l'expression de Pin1 se trouve augmentée dans les cancers et par son activité, elle activerait plusieurs oncogènes (tel que Ras et cycline D1) et inhiberait plusieurs suppresseurs de tumeur (tel que Pml, Daxx, Smad et Trf1). Ainsi, sa dérégulation contribuerait au développement de cancers (Lee et al., 2011; Liou et al., 2011). Par contre, les souris « knock-out » (KO) pour la protéine Pin1 développeraient avec l'âge une neurodégénérescence apparentée à la maladie d'Alzheimer où l'on observe la mort des neurones et la formation de plaques bêta-amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires. Ainsi, Pin1 serait bénéfique dans la maladie d'Alzheimer, mais néfaste dans les cancers (Lee et al., 2011). Finalement, Pin1 interagit avec plusieurs facteurs de transcription tels que ceux mentionnés plus haut de même que β -catenin, p70S6K et Raf-1, aussi identifiés sur le promoteur d'*APOD*. D'autres « *peptidyl-prolyl isomerase* » ont été repêchées sur le promoteur d'*APOD*, tel que Ppi-A, -D, -E, -G et -H (voir section 2 de la Table 3.1) et dont leur rôle en tant que facteur de transcription n'a jamais été démontré.

3.2.4 La protéine Stxbp1

La protéine Stxbp1 (« *Syntaxin-binding protein 1* ») ou Sec1/Munc18-1 est retrouvée abondamment sur le promoteur d'*APOD* avec plus d'une centaine de peptides ayant permis son identification en condition contrôle et près de la moitié en condition OC43. Stxbp1 est un régulateur clé dans la neurosécrétion et interagit avec les protéines syntaxine-1A/B (Han et

al., 2010), aussi retrouvées sur le promoteur quoique moins abondamment (section 8). La protéine Stxbp1 est principalement exprimée dans les neurones et joue un rôle important dans le relargage de neurotransmetteurs par fusion membranaire et exocytose des vésicules synaptiques (Verhage et al., 2000). En contraste avec sa localisation à la membrane présynaptique, Stxbp1 est détectée par immunofluorescence et microscopie électronique dans le noyau de neurones de rats adultes (Sharma et al., 2005). Dans cette même étude, il a aussi été démontré que Stxbp1 peut lier l'ADN double brin probablement par l'intermédiaire d'une autre protéine, puisqu'elle ne contient pas de domaine de liaison à l'ADN (Sharma et al., 2005). Bien que le rôle de Stxbp1 dans le noyau demeure inconnu, sa présence sur le promoteur d'*APOD* nous laisse spéculer qu'elle pourrait jouer un rôle dans la transcription des gènes.

3.2.5 Les protéines nucléoline et Frap1

Dans la section 1, nous montrons la présence des protéines Ncl (« *nucleolin* ») et Frap1 (« *FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1* » aussi connu sous le nom de mTOR) sur le promoteur d'*APOD*. Ces deux protéines ont été démontrées capables de réguler l'expression des gènes d'ARN ribosomaux en interagissant directement sur la machinerie transcriptionnelle régulant les ARN polymérases de type I et III (Kantidakis et al., 2010; Roger et al., 2002; Shor et al., 2010). Notre étude montre que ces protéines pourraient aussi interagir avec le promoteur des gènes de type II codant des protéines.

3.2.6 Les familles de facteur nucléaire

D'autres facteurs ont été identifiés et plusieurs, ayant un rôle bien établi dans la transcription, font partie de la même famille de protéines. Entre autres, nous avons purifié plusieurs protéines faisant partie de la famille des HDAC (section 3), des ARN hélicases (section 4), des facteurs d'épissage (section 9), des protéines chaperonnes de la famille « *Heat Shock* » (section 19), des protéines 14-3-3 (section 20), des HnRNPs (section 21), des snRNPs (section 22) et des THOC (section 27).

3.2.7 Les protéines HnRNPs

Parmi les familles de protéines mentionnées précédemment et retrouvées sur le promoteur d'*APOD*, les HnRNPs pour « Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins » sont parmi les plus abondantes des protéines nucléaires dans les cellules de mammifères (Patry et al., 2003). Il existe plus de 20 isoformes, désignées HnRNP A jusqu'à HnRNP U, qui sont associées avec les ARNm précurseurs (pré-ARNm) et plusieurs influencent la maturation de ces pré-ARNm ainsi que leur transport (Dreyfuss et al., 1993; Kajita et al., 1995). Plus précisément, elles joueraient un rôle dans plusieurs événements comme l'épissage alternatif, la polyadénylation, le « turnover », l'exportation des ARNm hors du noyau et leur circulation cytoplasmique ainsi que leur stabilité et leur traduction (He et al., 2005). Les particules 40S qui assemblent les ARN hétérogènes (ARNhn) sont composées en majeure partie par les protéines HnRNP A/B dont l'isoforme HnRNP A1 est la mieux caractérisée (Dreyfuss et al., 1993; He et al., 2005; Inoue et al., 2001). Certaines de ces protéines (hnRNP A1, A2, D, E, I et K) circulent continuellement et rapidement entre le noyau et le cytoplasme (Inoue et al., 2001). Les protéines HnRNPs participent aussi dans la régulation de l'expression de gènes. Ce rôle est rapporté dans la littérature entre autres pour les protéines hnRNP A/B (ou « *CARG-box binding factor A* »), D, K et U (Inoue et al., 2001). En ce qui concerne les protéines HnRNP U et A/B, elles ont été retrouvées sur le promoteur d'*APOD* dans les cellules NIH/3T3 en arrêt de croissance et dont les résultats ont été présentés dans le chapitre II.

3.2.8 Protéines associées aux maladies neurodégénératives

D'autres protéines intéressantes ont été répertoriées dans la section 13 (« *Neurodegenerative associated proteins* ») et sont impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives où elles sont retrouvées sous forme d'agrégats toxiques à l'intérieur de la cellule, mais peuvent aussi lier l'ADN (Jimenez, 2010). Ainsi, parmi ces protéines, nous avons repêché la protéine Mapt (aussi connue sous le nom de protéine Tau), Amyloïd bêta A4 (App), Huntingtin (Htt), α -synuclein (Snca), Superoxyde dismutase (Sod1/2) et TAR DNA-binding-43 (TDP-43). Les protéines Mapt et App sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer en formant respectivement des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires et des plaques amyloïdes extracellulaires (Jimenez, 2010). Des études montrent que le peptide bêta-amyloïde peut être localisé au noyau et interagir avec des facteurs de

transcription amenant à une régulation transcriptionnelle (Van Gassen and Annaert, 2003). Dans une récente étude, l'ajout de fragments peptidiques d'APP (A β 25-35) sur des cellules d'hippocampe (HT22)(Martinez et al., 2012) induit l'expression d'*ApoD* en réponse à des stress causant l'arrêt de croissance. De la même manière, la localisation au noyau de la protéine MAPT a été démontrée par plusieurs études et les auteurs spéculent une interaction de cette protéine avec l'ADN (Jimenez, 2010). En ce qui concerne les protéines Htt, Snca, Sod1/2 et TDP-43, elles sont respectivement impliquées dans les maladies de Huntington, Parkinson et Lou Gehrig (Lee et al., 2012) et où l'expression d'*APOD* est augmentée.

D'autres familles de protéines aussi présentes sur le promoteur d'*APOD* et dont leur rôle en tant que régulateur de la transcription est rarement reporté dans la littérature. Par contre, au moins un membre pour chaque famille, sinon plus, a été associé à la régulation transcriptionnelle dans la littérature. La description de quelques-unes d'entre elles sera présentée dans les paragraphes suivants.

3.2.9 Les protéines MAPK

Dans cette étude, on retrouve la plupart des membres de la famille MAPK (« *Mitogen-activated protein kinases* »). Ces protéines, Ras, Raf, MEK et ERK, sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation, notamment dans le contrôle du cycle cellulaire (Meloche and Pouyssegur, 2007). Cette voie de signalisation est activée par la liaison de ligands mitogéniques aux récepteurs tyrosine kinase ou couplés aux protéines G. Comme démontré dans le chapitre II, l'activité enzymatique des protéines Mapk-1/2 ou Erk-1/2 (ou originellement nommé dans la littérature Mapk3/1 et tel qu'indexé dans le tableau 3.1, section 5) est impliquée dans l'induction de l'expression génique d'*ApoD* lors de la déprivation de sérum (voir Figure 2.5 B). Dans le cortex de souris contrôle et infectées par le virus OC43, on voit que Mapk3/1, Map-2k1 (Mek1), -2k2 (Mek2), -2k4 (« JNK Kinase 1 »), -2k6 (Mek6 ou p38 Mapk) et A-Raf semblent lier le promoteur d'*APOD*. En accord avec ces résultats, des études ont montré par ChIP que la majorité des acteurs impliqués dans cette voie de signalisation sont recrutés directement aux promoteurs de gènes dans des cellules humaines (Mikula and Bomsztyk, 2011; Vicent et al., 2006). Parmi ces acteurs, on retrouve

GRB2, SOS, B-RAF, MEK et ERK. Ainsi, la voie de signalisation des MAPKs, influençant plusieurs processus cellulaires au niveau cytoplasmique, exerce une action directe au niveau des loci régulateurs des gènes. Cette évidence a été reproduite dans plusieurs autres études, notamment chez la levure et le rat, montrant aussi que les récepteurs tyrosine kinases, telles que le récepteur à l'insuline (Nelson et al., 2011), la protéine kinase A (PKA) (Pokholok et al., 2006), p38 MAPK (Simone et al., 2004) peuvent être recrutés sur la chromatine et peuvent réguler l'expression des gènes (Chow and Davis, 2006; Edmunds and Mahadevan, 2006).

3.2.10 Récepteurs cellulaires, facteur de croissance et AMPK

Plusieurs récepteurs cellulaires et facteurs de croissance ont été repêchés sur le promoteur d'*APOD* (section 28), entre autres : Fgf12 (« *Fibroblast factor 12* »), Ntrk2 (« *BDNF/NT-3 growth factors receptor* ») et EphA4 (« *Ephrin type-A receptor 4* »). Une autre molécule importante recrutée aux promoteurs de gènes est l'AMPK (« *Adenosine monophosphate-activated protein kinase* »), une protéine hétérotrimérique impliquée dans les voies de signalisation régulant l'homéostasie de l'énergie cellulaire (Bungard et al., 2010). Cette protéine est sensible et activée lors de la dérégulation des ratios ATP : AMP, notamment au cours de l'exercice physique (Hardie, 2007). Ici, nous montrons que Prkab2 (« *5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2* », voir section 12), l'une des sous-unités régulatrices d'AMPK, est recrutée au promoteur d'*APOD*.

3.2.11 Le complexe « *COP9 signalosome* » et le système ubiquitine-protéasome

Le complexe « *COP9 signalosome* » (CSN ou Cops) est composé des sous-unités Cops1 à Cops8 et dont plusieurs ont été détectées lors de l'analyse par spectrométrie de masse, à l'exception de Cops-1, -7 et -8 (section 25). Ce complexe régule la dégradation des protéines grâce à leur activité de déneddylation et déubiquitylation, impliquant le système ubiquitine-protéasome (Chamovitz, 2009). Quoi qu'il en soit, les protéines de ce complexe ont originellement été décrites comme facteurs de transcription (Chamovitz, 2009; Kato and Yoneda-Kato, 2009). Plus particulièrement, Cops5, aussi connu sous le nom de Jab1 (« *Jun-activation-domain-binding protein 1* »), est un coactivateur d'AP-1 (Claret et al., 1996). En

relation avec l'implication du complexe « *COP9 signalosome* » et le système ubiquitine-protéasome, nous montrons que plusieurs sous-unités régulatrices du complexe « *26S Proteasome* » (section 26) de même que les enzymes « *ubiquitin-conjugating* » (section 23) et « *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* » (section 24) se retrouvent au promoteur d'*APOD*. Des études antérieures montrent que les sous-unités du système ubiquitine-protéasome agissent directement sur des régions régulatrices de gènes indépendamment de leur activité protéolytique (Conaway et al., 2002; Kinyamu and Archer, 2007; Szutorisz et al., 2006). La protéine Uchl1 de la famille des « *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* » a été reportée pour être impliquée dans les maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Setsuie and Wada, 2007). Il est intéressant de constater que les protéines « *ubiquitin-conjugating enzymes* », permettant la dégradation des protéines en ajoutant des molécules d'ubiquitines, se retrouvent uniquement en condition contrôle sur le promoteur d'*APOD*. Effectivement, les « *ubiquitin-conjugating enzymes* » sont des répresseurs en interagissant avec des facteurs de transcription (Hock and Vousden, 2010). Ainsi, ces protéines pourraient être impliquées dans la répression du gène d'*APOD* en condition normale et cet effet serait contrecarré lors de l'infection par 1) l'absence de ces protéines « *ubiquitin-conjugating enzymes* » en tant que répresseur et 2) par les membres de la famille des « *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* » et du complexe « *COP9 signalosome* », se retrouvant sur le promoteur d'*APOD* dans les deux conditions, et dont leur rôle est d'augmenter la stabilité des protéines en empêchant leur dégradation par le protéasome ou encore d'induire l'expression des gènes en activant les facteurs de transcription (Visser et al., 2008; Woelk et al., 2007).

3.2.12 Les « *Kinesin* », « *Dynein* », « *Importin* », MAPT et les protéines endocytiques

Finalement, nous avons identifié plusieurs membres de la famille des « *Kinesin* » (section 14), « *Dynein* » (section 15), « *Importin* » (section 16), MAP pour « *Microtubule-associated proteins* » (section 18) et des protéines impliquées dans les voies d'endocytose tel que les clathrines (section 11) et les protéines Rab de la famille des « *Ras-related proteins* » (section 7). Il est maintenant établi que ces protéines endocytiques ont une fonction dans le noyau notamment dans la régulation des gènes (Kang et al., 2005; Mills et al., 2005; Pilecka et al.,

2007). Parmi ces protéines également repêchées sur le promoteur d'*APOD*, on retrouve Appl1 (Pilecka et al., 2007), B-arrestin1/2 (Kang et al., 2005), Eecrt, Bin1, amphiphysin II (Pyrzynska et al., 2009) et Hip1 (Mills et al., 2005), ainsi que plusieurs autres. L'endocytose est un mécanisme de régulation permettant d'atténuer les signaux de transduction en internalisant les récepteurs activés sur la membrane plasmique et de les diriger vers les lysosomes pour leur dégradation (Miaczynska et al., 2004). De plus, la voie endocytaire ne se résume pas à une destination vers les lysosomes. Les endosomes peuvent être dirigés vers plusieurs compartiments intracellulaire d'où leur fonction multiple et diverse. Il est clairement démontré que malgré une internalisation des complexes ligands-récepteurs, les voies de signalisation demeurent quand même actives à différents endroits à l'intérieur de la cellule, notamment dans le noyau (Pyrzynska et al., 2009). Concernant ces faits, APPL1 a été récemment caractérisée et retrouvée dans un complexe avec les protéines NURD1 et HDAC ayant une activité dans la transcription des gènes (Banach-Orlowska et al., 2009) et aussi comme activateur du facteur de transcription β -catenin (Rashid et al., 2009). Nous avons aussi identifié la protéine Chc ou Ctlc (« *Clathrin heavy chain* »), une sous-unité des clathrines et permettant l'invagination de la membrane plasmique en vésicules. La protéine Chc peut recruter p300 à p53 afin d'augmenter l'activité transcriptionnelle directement aux promoteurs de gènes (Enari et al., 2006). Rab5 est une protéine régulatrice importante dans le transport des endosomes précoces le long des microtubules ainsi que leur fusion avec des organelles cibles. De plus, RAB5 interagit avec APPL1/2 (Benmerah, 2004). Cette interaction est nécessaire pour la localisation nucléaire des protéines APPLs. Ainsi, la localisation et les fonctions de ces protéines endocytiques dans le noyau pourraient expliquer la présence de plusieurs protéines identifiées sur le promoteur d'*APOD*, dont leur rôle en tant que régulateur de la transcription n'a jamais été rapporté dans la littérature. Par exemple, l'ApoE sécrétée est connue pour jouer un rôle important dans le transport du cholestérol et des lipoprotéines associées, pour ensuite être internalisée dans les compartiments d'endosomes et lysosomes et plusieurs études montrent la présence de cette protéine dans le noyau (voir chapitre IV).

Cette étude présente l'identification de plusieurs facteurs nucléaires appartenant à différentes familles de protéines et capables de lier le promoteur d'*APOD* *in vitro*. Ces protéines ont aussi des fonctions diverses et reflètent la complexité de régulation du gène d'*APOD*. De plus, le promoteur d'*APOD* contient plusieurs éléments régulateurs pouvant expliquer ces faits. Ces résultats apportent des outils de travail afin de mieux comprendre la régulation de l'expression génique d'*APOD*.

Table 3.1. Liste des facteurs de transcription liant le promoteur d'*APOD* dans le cortex de souris saines ou infectées par le coronavirus humain OC43.

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
Section 1. Nuclear Factors with known transcription or DNA binding activities														
Q3UHU8 General transcription factor III I GN=Gtf2l	Q3UHU8	108 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Q3UJ23 General transcription factor TFIIB GN=Gtf2b	Q3UJ23 (+2)	35 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SP16H FACT complex subunit SPT16 GN=Spt16h	Q92089	120 kDa	3	19	3	14	1	15	2	12	3	14	4	13
RCD1 Cell differentiation protein RCD1 homolog GN=Rgcd1	Q9JKY0	34 kDa	2	0	2	1	0	2	0	0	0	0	0	1
B2RXR3 CCR4-Not transcription complex subunit 1 GN=Cnot1	B2RXR3 (+2)	266 kDa	0	3	1	3	0	2	1	0	0	0	0	0
Q3V231 CCR4-Not transcription complex subunit 7 GN=Cnot7	Q3V231 (+1)	33 kDa	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
CBX3 Chromobox protein homolog 3 GN=Cbx3	P23198 (+2)	21 kDa	3	5	6	4	3	3	2	5	4	5	3	4
CBX5 Chromobox protein homolog 5 GN=Cbx5	Q61686	22 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
TF1B8 Transcription intermediary factor 1-beta GN=Trim28	Q62318	89 kDa	0	7	3	6	3	7	0	7	0	10	0	7
TFCP2 Alpha-globin transcription factor CP2 GN=Tcfcp2	Q9ERA0	57 kDa	2	9	0	10	2	8	2	7	3	8	2	6
ELC Transcription elongation factor B polypeptide 2 GN=Tceb2	P82869	13 kDa	2	4	5	3	2	3	2	1	3	2	3	2
ELC Transcription elongation factor B polypeptide 1 GN=Tceb1	P83940	12 kDa	2	0	3	3	2	3	3	1	4	5	2	2
TCF4 Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 GN=Sub1	P11031	14 kDa	0	4	3	1	2	2	3	2	0	3	2	2
TCEA1 Transcription elongation factor A protein 1 GN=Tcea1	P10711	34 kDa	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
PTRF Polymerase I and transcript release factor GN=Ptrf	O54724	44 kDa	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1
PAF1 RNA polymerase II-associated factor 1 homolog GN=Paf1	Q8K278	61 kDa	2	4	3	3	1	6	2	7	3	10	2	7
CTR9 RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog GN=Ctr9	Q62018	133 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
LEO1 RNA polymerase-associated protein LEO1 GN=Leo1	Q5XJE5	76 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	2	0
TOP2B DNA topoisomerase 2-beta GN=Top2b	Q64511	182 kDa	0	2	0	4	0	2	0	0	0	2	0	3
RPB2 DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2 GN=Polr2b	Q8CFI7	134 kDa	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
CCAR1 Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 GN=Ccar1	Q8CH18	132 kDa	0	9	0	4	0	0	1	7	0	11	0	17
Q3UT17 (Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA interacting 1 GN=Pin1	Q3UT17 (+1)	18 kDa	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Q3UJX2 Catenin beta-1 GN=Ctnnb1	Q3UJX2 (+1)	65 kDa	6	11	6	13	7	9	6	16	6	12	7	16
CTNB1 Catenin beta-1 homolog GN=Ctnnb1	Q02248 (+1)	85 kDa	9	0	3	3	5	2	9	2	5	3	5	4
A1A558 Daxx protein GN=Daxx	A1A558 (+7)	81 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0
B2RS19 Max protein GN=Max	B2RS19 (+1)	18 kDa	0	2	0	0	0	2	0	3	2	2	1	3
GELS Gelsolin GN=Gsn	P13020 (+4)	86 kDa	0	2	0	2	0	0	0	0	0	3	0	2
FLI1Flightless-1 homolog GN=Flil	Q9J128	145 kDa	0	5	1	4	0	2	5	2	4	4	1	4
BIN1 Myc box-dependent-interacting protein 1 GN=Bin1	O08539	64 kDa	33	26	20	25	28	27	31	24	26	29	28	22
AZAK5 C-myc binding protein GN=Mycbp	AZAK5 (+2)	17 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MBB1A Myb-binding protein 1A GN=Mybbp1a	Q77PV4	152 kDa	2	9	2	11	0	10	1	8	0	9	1	9
GCFC GC-rich sequence DNA-binding factor homolog GN=Gcfc	P58501	105 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PGRC2 Membrane-associated progesterone receptor component 2 GN=Pgrmc2	Q80UU9	23 kDa	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
PTEN Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase PTEN GN=Pten	O08586 (+3)	47 kDa	0	3	2	3	2	0	2	3	2	0	2	0
FL20A Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 GN=FAM120A	Q6A0A9	122 kDa	0	12	2	10	3	12	0	8	0	10	0	8
ELP1 Elongator complex protein 1 GN=Elk1ap	Q7TT37	150 kDa	0	4	0	3	0	2	0	1	0	3	0	4
IKKB Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta GN=Ikbkb	O88351 (+2)	87 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
NUCL Nucleolin GN=Ncl	P09405 (+3)	77 kDa	6	11	5	9	5	12	8	12	4	5	1	4
SIRT2 NAD-dependent deacetylase sirtuin-2 GN=Sirt2	Q8VDQ8	43 kDa	14	1	9	2	12	1	12	4	11	2	8	2
STMN1 Stathmin GN=Stmn1	P54227 (+5)	17 kDa	0	2	0	1	2	1	0	0	2	1	1	1
Q3TW11 Signal transducer and activator of transcription 1 GN=Stat1	Q3TW11	87 kDa	0	2	0	3	0	2	0	3	0	1	0	2
Q32NY6 Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1 GN=Nr2f1	Q32NY6 (+3)	46 kDa	0	3	0	4	0	2	0	3	2	0	3	0
Q3UX19 Nuclear factor 45 GN=Irf2	Q3UX19 (+1)	43 kDa	21	40	19	36	18	37	22	42	20	38	20	43
Q45VK5 Nuclear factor 90 GN=Irf3	Q45VK5 (+2)	76 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	4
PURB Transcriptional activator protein Pur-beta GN=Purb	O35295	34 kDa	8	14	8	15	6	16	13	20	12	12	6	10
PURA Transcriptional activator protein Pur-alpha GN=Pura	P42669	35 kDa	11	14	11	14	13	16	14	15	7	12	5	11
ENY2 Enhancer of yellow 2 transcription factor homolog GN=Eny2	Q9JIX0	12 kDa	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Q80Y25 Nuclear mitotic apparatus protein 1 GN=Numa1	Q80Y35	236 kDa	0	11	5	10	1	4	4	10	1	8	3	7
SMCA5 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 GN=Smrca5	Q91ZW3	122 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Q3UD46 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1 GN=Smrca1	Q3UD44 (+1)	43 kDa	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q3UID0 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 2 GN=Smrca2	Q3UID0 (+1)	125 kDa	0	1	0	0	0	3	0	2	0	3	0	3

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
SMCE1 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator chromatin subfamily member 1 GN=Smrce1	Q54941	47 kDa	0	5	0	4	0	0	0	5	0	4	0	7
PDSS5 Sister chromatid cohesion protein PDSS5 homolog B GN=Pdss5b	Q4VA53	164 kDa	2	16	2	11	2	9	0	11	0	12	0	12
PDSS5A Sister chromatid cohesion protein PDSS5 homolog A GN=Pdss5a	Q6A026	150 kDa	0	3	0	4	0	3	0	3	0	2	0	2
AZAE6 Four and a half LIM domains 1 GN=Fhl1	AZAE6 (+2)	35 kDa	2	4	1	5	0	3	3	3	3	3	3	3
FHL2 Four and a half LIM domains protein 2 GN=Fhl2	O70433 (+1)	32 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1
ERH Enhancer of rudimentary homolog GN=Erh	P84089	12 kDa	2	3	1	12	1	6	0	0	0	0	2	5
Q4FJT0 Mat3 protein GN=Mat3	Q4FJT0 (+2)	95 kDa	13	34	15	16	7	20	10	16	7	14	1	9
Q5U438 Nucleophosmin 1 GN=Npm1	Q5U438 (+1)	33 kDa	6	4	10	7	8	7	7	5	7	4	4	5
B2RUG7 Zinc finger RNA binding protein GN=Zfr	B2RUG7	114 kDa	3	4	4	5	3	5	2	4	0	2	0	2
B2M1R7 Poly(RC) binding protein 2 GN=Pcbp2	B2M1R7	38 kDa	2	9	4	6	2	6	8	6	4	6	5	6
PCBP1 Poly(RC)-binding protein 1 GN=Pcbp1	P60335	37 kDa	5	4	5	6	4	8	3	8	4	7	4	5
PTBP1 Polypyrimidine tract-binding protein 1 GN=Ptbp1	P17225 (+6)	56 kDa	0	5	0	4	0	0	0	4	0	2	0	0
PTBP2 Polypyrimidine tract-binding protein 2 GN=Ptbp2	Q91231	57 kDa	0	0	0	0	2	0	2	1	0	2	0	0
TAGL3 Transgelin-3 GN=Taglin3	Q9R108	22 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	0	0
DDB1 DNA damage-binding protein 1 GN=Ddb1	Q3U1J4	127 kDa	3	4	1	5	4	5	2	3	5	8	3	6
SATB2 DNA-binding protein SATB2 GN=Satb2	Q8V124	83 kDa	2	1	5	2	5	4	6	4	1	4	2	4
BZW1 Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 GN=Bzw1	Q9QC66	48 kDa	2	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	2
RENT1 Regulator of nonsense transcripts 1 GN=Upr1	Q9EPU0	124 kDa	0	1	2	5	0	1	4	0	2	0	0	2
SCAI Protein SCAI GN=Scal	Q8C8N2	70 kDa	11	6	3	2	5	7	8	7	9	5	9	3
CEND Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1 GN=Cend1	Q9JIC6	15 kDa	3	2	0	3	0	0	2	0	2	0	0	0
A2A875 Retinoblastoma binding protein 4 GN=Rbbp4	A2A875 (+1)	48 kDa	4	7	2	8	3	6	2	7	3	7	2	5
A2AF11 Retinoblastoma binding protein 7 GN=Rbbp7	A2AF11 (+1)	47 kDa	0	0	0	4	0	0	0	2	0	1	0	0
SEP15 15 kDa selenoprotein GN=Sep15	Q9ERR7	18 kDa	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NDRG2 Putative uncharacterized protein GN=Nup155	Q3UL43 (+3)	150 kDa	0	0	2	0	1	0	0	0	2	0	0	0
NDRG3 Protein NDRG3 GN=Ndr3	Q9QYG0	41 kDa	6	0	8	0	6	0	5	0	5	0	7	0
PLRG1 Pleiotropic regulator 1 GN=Plrg1	Q9QYF9 (+1)	42 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Q6ZWMS Budding inhibited by benzimidazoles 3 homolog (S. cerevisiae) GN=Bub3	Q922V4	57 kDa	0	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0
A1L366 RAD21 homolog (S. pombe) GN=Rad21	Q6ZWMS	37 kDa	5	8	5	10	8	9	11	7	7	6	6	10
RUVB1 RuvB-like 1 GN=Ruvb1	A1L366 (+4)	72 kDa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q3UXP2 RuvB-like 2 GN=Ruvb2	P60122 (+1)	50 kDa	0	6	2	8	2	5	0	6	2	6	2	7
Q2KH70 FK506 binding protein 1.2-rapamycin associated protein 1 GN=Frp1	Q3UXP2 (+1)	51 kDa	0	3	0	7	0	3	0	8	0	3	0	8
UBP1 Upstream-binding protein 1 GN=Ubp1	Q2KH70 (+1)	289 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
FUBP2 Far upstream element-binding protein 2 GN=Khsrp	Q81157	60 kDa	4	7	2	9	3	10	3	9	0	6	0	8
USF2 Upstream stimulatory factor 2 GN=Usf2	Q3U0V1	77 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
PML Probable transcription factor PML GN=Pml	Q64705 (+4)	37 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2
ABR Active breakpoint cluster region-related protein GN=Abp	Q60953	98 kDa	0	2	0	3	0	2	0	2	0	2	0	2
AB12 Abi interactor 2 GN=Abi2	Q5SSL4	98 kDa	8	9	7	9	13	5	8	4	12	11	9	6
A2ADH4 Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (Human)	P62484 (+2)	49 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3
GN=Atx														
SPF27 Pre-mRNA-splicing factor SPF27 GN=Bcas2	A2ADH4	279 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	4
BRM11 Breast cancer metastasis-suppressor 1-like protein GN=Brms1l	Q9D287	26 kDa	1	10	6	12	6	13	1	6	7	14	5	13
BASP1 Brain acid soluble protein 1 GN=Basp1	Q3U1T3	38 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MCTS1 Malignant T cell amplified sequence 1 GN=Mcts1	Q91XV3	22 kDa	6	17	5	17	6	15	2	16	2	15	3	15
Q77PR0 Ring finger protein 14 GN=Rnf14	Q9DB27	21 kDa	3	2	6	2	4	2	4	5	2	3	4	4
PHF11 PHD finger protein 11 GN=Phf11	Q77PR0 (+1)	55 kDa	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
ANK32A Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A GN=Anp32a	A6H5X4	38 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q7M739 Nuclear pore complex-associated intranuclear coiled-coil protein TPR GN=Tpr	Q55381	29 kDa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RAN GTP-binding nuclear protein Ran GN=Ran	Q7M739	267 kDa	12	25	13	28	7	29	13	38	19	43	10	38
NCEP1 Nuclear cap-binding protein subunit 1 GN=Ncbp1	P62827 (+1)	24 kDa	8	3	8	3	9	2	4	4	5	4	5	3
RPR14 Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A GN=Rpr14	Q3UYV9	92 kDa	3	5	3	4	3	3	3	3	0	7	2	4
RPR18 Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B GN=Rpr18	Q8VDS4	36 kDa	0	2	0	1	0	2	0	3	0	1	0	2
ARRB1 Beta-arrestin-1 GN=Arrb1	Q8VDS4	37 kDa	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
STRAP Serine-threonine kinase receptor-associated protein GN=Strap	Q8BW68	47 kDa	2	4	0	3	0	3	2	0	0	3	2	3
Q9R5L1 Complement component 1, q subcomponent binding protein GN=C1qbp	Q9R5L1	38 kDa	0	0	4	0	1	0	2	0	2	0	0	0
NARG1 NMDA receptor-regulated protein 1 GN=Narg1	Q80UM3	101 kDa	3	8	2	0	0	2	1	2	0	5	0	4

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1			region 2			region 3			region 4			region 5			region 6		
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
CTBP1 C-terminal-binding protein 1 GN=CTBP1	O88712	48 kDa	9	13	9	13	9	13	11	11	11	11	10	11	12	12	11	11	11	14
UHRF1 UHRF1-binding protein 1-like GN=UHRF1bp1	A2RSJ4	162 kDa	1	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	1
COF1 Coffin-1 GN=COF1	P18760	19 kDa	9	9	9	2	9	2	8	2	8	2	9	0	7	0	8	8	2	2
TEZP2 Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1 GN=Terf2ip	Q91VL8	43 kDa	6	9	2	12	6	9	6	9	2	13	2	13	4	11	0	8	0	0
B72P42 Cask protein GN=Cask	B72P42 (+2)	104 kDa	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	3	4	0	2	0	0
MIF Macrophage migration inhibitory factor GN=Mif	P34884	13 kDa	0	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	5	0	2	0	0	0
SMHD1 Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 GN=Smchd1	Q6P5D8	226 kDa	0	3	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	5	0	0	4	4
Q3TK29 Tumour necrosis factor type1 receptor associated protein 1 GN=Trap1	Q3TK29 (+5)	80 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q91XB1 DNA-binding protein SATB2 GN=Satb1	Q91XB1	86 kDa	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RBP2 E3 SUMO-protein ligase RanBP2 GN=Ranbp2	Q9ERU9	341 kDa	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CNBP Cellular nucleic acid-binding protein GN=Cnbp	P53996 (+3)	20 kDa	2	0	1	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
IF4A1 Eukaryotic initiation factor 4A-1 GN=EIF4a1	P08843 (+3)	46 kDa	104	54	108	51	91	44	115	62	80	53	78	47	0	0	0	0	0	0
STXB1 Syntaxin-binding protein 1 GN=Stxbp1	O08599	68 kDa	7	0	8	2	8	2	8	0	6	1	2	3	2	0	3	2	0	0
NPS1 Protein NipSnap homolog 1 GN=Nipsnap1	O55125	33 kDa	3	0	2	4	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
B72NL2 Nucleosome assembly protein 1-like 4ap114 protein GN=Nap114	B72NL2 (+2)	44 kDa	6	0	4	1	6	0	4	0	4	0	4	0	5	0	4	0	0	0
NP1L1 Nucleosome assembly protein 1-like 1 GN=Nap111	P28656 (+2)	45 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HDR2 Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 GN=Hdgrp2	Q3UMU9	74 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RBM14 RNA-binding protein 14 GN=Rbm14	Q8C2Q3	69 kDa	0	0	2	1	0	0	3	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0
RBM3 Putative RNA-binding protein 3 GN=Rbm3	O98086	17 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0	0
NEB2 Neurabin-2 GN=Ppp1r9b	Q6R891	90 kDa	0	0	0	4	0	4	0	1	0	4	0	4	0	6	0	5	0	0
CPSP1 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 GN=Nudt21	Q9CQF3	26 kDa	6	9	7	4	7	8	4	5	8	4	3	11	4	8	3	3	11	0
CPSP2 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 GN=Cpsf2	Q9EPU4	161 kDa	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	4	0	3	0	0
CPSP2 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 GN=Cpsf2	O35218	88 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCC3 Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 GN=Brcc3	Q35218	88 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q8R2K3 Single-stranded DNA binding protein 1 GN=Ssbp1	P46737	33 kDa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q8R2K3 Single-stranded DNA binding protein 2 GN=Ssbp2	Q8R2K3 (+1)	17 kDa	3	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	3	5	1	2	2	0	0
NDKA Nucleoside diphosphate kinase A GN=Nme1	P15532 (+1)	17 kDa	2	1	3	3	3	3	3	1	4	3	4	1	5	0	0	1	0	0
H4 Histone H4 GN=Hist1h4a	P62806 (+1)	11 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLAUY8 N-acetyltransferase ARD1 homolog GN=Ard1	BLAUY8 (+8)	25 kDa	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INT3 Integrator complex subunit 3 GN=Ints3	Q7TPD0	118 kDa	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SRPK2 Serine/threonine-protein kinase SRPK2 GN=Sprk2	O54781 (+1)	77 kDa	0	4	2	2	2	3	2	3	2	3	2	3	3	3	2	4	4	4
SRPK1 Serine/threonine-protein kinase SRPK1 GN=Sprk1	O70551 (+1)	73 kDa	0	3	0	0	3	0	0	0	0	5	0	5	0	3	0	3	0	0
Q3THQ5 Stress-induced phosphoprotein 1 GN=Stip1	Q3THQ5	63 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Q3TD70 Tripartite motif protein 3 GN=Trim3	Q3TD70 (+1)	78 kDa	4	6	3	6	3	7	0	3	7	0	3	2	4	4	2	7	0	0
TRL46 Tripartite motif-containing protein 46 GN=Trim46	Q7TNM2	83 kDa	0	3	0	4	0	3	0	3	0	2	0	0	2	0	0	4	0	0
Q3TR28 Tripartite motif protein 9 GN=Trim9	Q3TR28 (+1)	87 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
RBX2 RING-box protein 2 GN=Rnf7	Q80V11	80 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WASF1 Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1 GN=Wasf1	Q9RSH6	13 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K56A5 Ribosomal protein S6 kinase alpha-5 GN=Rps6ka5	Q8C050	62 kDa	2	7	4	3	4	3	2	3	3	3	3	2	5	3	3	5	3	5
Q78QY3 ELAV-like protein 1 GN=Elavl1	Q78QY3 (+4)	97 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0
NACAM Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form GN=Naca	Q78QY3	36 kDa	7	12	4	9	9	10	8	9	9	9	8	9	8	8	6	7	7	14
CACO1 Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1 GN=Calcoo1	P70670	221 kDa	5	10	8	8	7	11	10	10	7	7	10	7	6	10	6	6	14	0
KCC4 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV GN=Camk4	Q8CGU1	77 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3KG93 Amine oxidase (Flavin containing) domain 2 GN=Aof2	P08414 (+1)	53 kDa	2	0	4	0	3	0	2	0	2	0	2	0	2	0	4	0	0	0
TPRKB TP53RK-binding protein GN=Trprkb	Q3KQZ7	95 kDa	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
Q57027 SIN3 transcription regulator homolog A (yeast) GN=Sin3a	Q57027 (+1)	47 kDa	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2AW05 Structure specific recognition protein 1 GN=Srp1	Q57027	146 kDa	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q3V3E0 SMAD family member 3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3) GN=Smad3	A2AW05	72 kDa	0	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	8	0	0
Q3UHL8 Leucine zipper transcription factor-like 1 GN=Lzf1f1	Q3V3E0 (+1)	42 kDa	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q3TSU7 Glucocorticoid receptor DNA binding factor1 (GAP-associated protein 190) homolog GN=Grf1	Q3UHL8 (+2)	34 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0
Q692P4 Cofactor of BRCA1 GN=Cobra1	Q3TSU7 (+1)	135 kDa	3	2	2	2	1	4	4	4	4	4	5	4	3	5	2	2	2	2
Q5DTP7 Chromodomain helicase DNA binding protein 4 GN=Chd4	Q692P4 (+1)	59 kDa	0	0	3	2	1	4	0	2	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0
	Q5DTP7 (+1)	221 kDa	0	3	0	0	4	5	5	5	1	3	1	3	0	3	0	3	0	2

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
Section 2. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family														
A2BG18 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H GN=Pph	A2BG18 (+3)	17 kDa	0	0	0	2	0	1	0	0	0	2	0	0
PP1E Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E GN=Ppie	Q9QZH3	33 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0
PP1A Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A GN=Ppia	P17742 (+1)	18 kDa	16	2	10	0	12	3	10	2	9	0	10	0
Q3UB60 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D GN=Ppid	Q3UB60 (+1)	41 kDa	0	0	3	0	2	0	1	0	2	0	1	0
B2RW75 Peptidyl-prolyl isomerase G (Cyclophilin G) GN=Ppig	B2RW75	88 kDa	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Section 3. HDAC family														
HDAC2 Histone deacetylase 2 GN=Hdac2	P70288	55 kDa	0	4	4	6	0	4	0	4	0	9	0	5
HDAC1 Histone deacetylase 1 GN=Hdac1	O09106	55 kDa	0	2	0	0	0	2	0	0	0	3	0	3
Q8CGC3 Hdac6 protein GN=Hdac6	Q8CGC3 (+4)	126 kDa	2	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
SAP18 Histone deacetylase complex subunit SAP18 GN=Sap18	O55128	18 kDa	1	4	3	2	1	3	1	2	0	1	2	2
Section 4. RNA helicase														
DDX1 ATP-dependent RNA helicase DDX1 GN=Ddx1	Q91VR5	83 kDa	2	9	4	5	4	8	4	4	7	7	4	13
A1L333 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 GN=Ddx5	A1L333 (+5)	69 kDa	2	0	0	0	0	6	0	2	1	1	0	0
DDX6 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 GN=Ddx6	P54823	54 kDa	0	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0
DHX9 ATP-dependent RNA helicase A GN=Dhx9	O70133	149 kDa	2	17	3	17	3	14	4	12	1	16	0	12
DHX29 ATP-dependent RNA helicase DDX29 GN=Dhx29	Q6PGC1	154 kDa	0	3	0	2	0	3	0	0	0	0	0	1
UAP56 Spliceosome RNA helicase Bat1 GN=Bat1	Q9ZLN5	49 kDa	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Q3UF95 Putative uncharacterized protein GN=Bat3	Q3UF95 (+1)	119 kDa	3	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0
DHX30 Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 GN=Dhx30	Q99PU8 (+1)	137 kDa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Section 5. MAPK family and related proteins														
MKO3 Mitogen-activated protein kinase 3 GN=Mapk3	Q63844	43 kDa	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0
MK01 Mitogen-activated protein kinase 1 GN=Mapk1	P63085 (+1)	41 kDa	2	0	4	2	2	4	6	0	6	2	5	2
MP2K1 Dual specificity mitogen-activated protein kinase 1 GN=Map2k1	P31938 (+2)	43 kDa	4	7	15	6	12	3	6	4	9	6	10	0
MP2K2 Dual specificity mitogen-activated protein kinase 2 GN=Map2k2	Q63932 (+2)	44 kDa	3	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0
MP2K4 Dual specificity mitogen-activated protein kinase 4 GN=Map2k4	P47809	44 kDa	4	1	9	0	10	3	9	1	5	0	6	1
MP2K6 Dual specificity mitogen-activated protein kinase 6 GN=Map2k6	P70236 (+1)	37 kDa	2	0	5	0	2	0	2	0	3	0	3	0
ARAF A-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase GN=Araf	P04627	68 kDa	2	0	5	3	5	4	0	0	3	0	4	0
Section 6. Ras associated proteins														
Q99K69 RAS protein activator like 1 (GAP1 like) GN=Rasal1	Q99K69	89 kDa	12	5	8	3	12	3	10	4	6	8	7	6
G3BP2 Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 GN=G3bp2	P97379 (+3)	54 kDa	4	1	2	2	0	0	0	3	1	3	3	0
RASH GTPase HRas GN=Hras1	Q61411 (+2)	21 kDa	3	0	3	0	0	0	3	0	3	0	2	0
RIN1 Ras and Rab interactor 1 GN=Rin1	Q921Q7	83 kDa	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0
GRP2 RAS guanyl-releasing protein 2 GN=Rasgrp2	Q9QU69	69 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Section 7. Ras-related proteins (Rab)														
RP3A Rabphilin-3A GN=Rph3a	P47708 (+1)	75 kDa	6	5	9	4	7	6	10	5	4	4	7	2
RAB1B Ras-related protein Rab-1B GN=Rab1b	Q9D1G1	22 kDa	6	2	5	2	7	2	2	2	6	1	5	0
RAB3A Ras-related protein Rab-3A GN=Rab3a	P63011	25 kDa	5	5	4	0	5	4	3	4	5	4	3	0
RBGPR Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit GN=Rab3gap2	Q88MG7	153 kDa	5	2	4	2	5	4	6	2	3	0	3	1
RAB10 Ras-related protein Rab-10 GN=Rab10	P61027	23 kDa	4	1	4	0	3	0	4	3	3	4	3	0
RAB11B Ras-related protein Rab-11B GN=Rab11b	P46638	24 kDa	3	2	1	1	2	0	1	0	1	0	3	0
Q3TPB6 Putative uncharacterized protein GN=Rab3gap1	Q3TPB6 (+1)	110 kDa	4	0	3	2	4	0	0	2	0	2	0	0
RBGP1 Rab GTPase-activating protein 1 GN=Rabgap1	A2AWA9	121 kDa	3	0	4	0	4	0	0	0	3	0	0	0
RABE1 Rab GTPase-binding effector protein 1 GN=Rabep1	Q35551 (+2)	100 kDa	0	0	4	0	2	2	2	0	4	2	3	0
RAB14 Ras-related protein Rab-14 GN=Rab14	Q91V41	24 kDa	1	2	3	0	2	0	2	0	2	1	2	0
GDIA Rab GDP dissociation inhibitor alpha GN=Gdi1	P50396	51 kDa	0	0	4	0	3	0	3	0	3	0	2	0
RAB6B Ras-related protein Rab-6B GN=Rab6b	P61294	23 kDa	1	2	2	0	0	0	0	0	2	0	1	0
Q3TCT9 Putative uncharacterized protein GN=Rab5c	Q3TCT9	23 kDa	0	0	2	1	2	0	0	0	2	0	0	0
RBG12 ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1 GN=Erc1	Q99MI1	128 kDa	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0
RIN1 Ras and Rab interactor 1 GN=Rin1	Q921Q7	83 kDa	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0
P62821 Putative uncharacterized protein GN=	P62821 (+1)	23 kDa	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43		
RAB1A Ras-related protein Rab-1A GN=Rab1A	Q3UIH7 (+1)	65 kDa	3	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Q3UIH7 Putative uncharacterized protein GN=Rabgga	P53994 (+1)	24 kDa	3	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0
RAB2A Ras-related protein Rab-2A GN=Rab2a	P55258 (+1)	24 kDa	2	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0
RAB8A Ras-related protein Rab-8A GN=Rab8a	P61028	24 kDa	0	0	2	0	0	0	2	0	2	0	0	0
RAB8B Ras-related protein Rab-8B GN=Rab8b	Q6PHN9	23 kDa	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RAB35 Ras-related protein Rab-35 GN=Rab35	P55288 (+1)	27 kDa	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0
RAB23 Ras-related protein Rab-23 GN=Rab23	A2CG35 (+1)	32 kDa	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2CG35 RAB12, member RAS oncogene family GN=Rab12	A2A7Z6 (+1)	26 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2A7Z6 RAB38, member RAS oncogene family GN=Rab3b	P47708 (+1)	75 kDa	6	5	9	4	7	6	10	5	4	7	2	4
RAP28 Ras-related protein Rap-2b GN=Rap2b	P61226	21 kDa	0	0	0	0	3	2	0	3	0	0	0	0
RAP2A Ras-related protein Rap-2a GN=Rap2a	Q80ZJ1	21 kDa	2	0	3	0	0	0	2	0	2	0	2	0
Section 8. Syntaxin														
STX18 Syntaxin-1B GN=Stx1b	P61264	33 kDa	14	6	12	5	11	3	14	5	11	4	7	3
STX1A Syntaxin-1A GN=Stx1a	Q35526 (+1)	33 kDa	4	5	9	0	4	2	9	4	3	0	7	3
Section 9. Splicing factors														
PURF60 Poly(U)-binding-splicing factor PURF60 GN=Pu160	QJUEB3	60 kDa	7	12	3	8	9	10	7	12	7	9	10	9
SF3B3 Splicing factor 3B subunit 3 GN=SF3b3	Q92IM3	136 kDa	0	15	0	18	0	11	0	14	2	12	0	15
SFRS1 Splicing factor, arginine/serine-rich 1 GN=Sfrs1	Q6PDM2	28 kDa	0	4	0	2	0	0	3	5	0	2	2	4
SF3B1 Splicing factor 3B subunit 1 GN=SF3b1	Q99NB9	146 kDa	0	2	0	2	0	0	0	3	0	2	0	0
SF3A3 Splicing factor 3A subunit 3 GN=SF3a3	Q9DE54	59 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PSP1 PC4 and SFRS1-interacting protein GN=Psp1	Q99JF8 (+2)	60 kDa	0	5	0	3	0	0	0	4	0	3	0	2
Q3THA6 Putative uncharacterized protein GN=Sfrs7	Q3THA6 (+1)	27 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	2	2	0	3
Q8C671 Putative uncharacterized protein GN=Sfrs2	Q8C671 (+1)	29 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Q542V3 Putative uncharacterized protein GN=Sfrs4	Q542V3 (+3)	56 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Section 10. Exportin														
XPO1 Exportin-1 GN=Xpo1	Q6PSF9	123 kDa	12	0	9	0	3	0	8	0	4	0	6	0
XPO2 Exportin-2 GN=Cse11	Q9ERK4	110 kDa	7	3	5	5	2	2	3	7	4	3	0	1
XPO7 Exportin-7 GN=Xpo7	Q9EPK7	124 kDa	3	0	2	0	2	0	2	2	3	0	2	0
Section 11. Clathrin associated proteins														
Q55XR6 Clathrin, heavy polypeptide (Hc) GN=Cltc	Q55XR6 (+2)	192 kDa	112	72	114	71	113	61	104	65	120	60	134	44
AP180 Clathrin coat assembly protein AP180 GN=Snap91	Q61548	92 kDa	23	12	26	16	16	15	19	21	20	22	18	16
81AWD8 Clathrin light polypeptide (Lca) GN=Cltc	81AWD8	26 kDa	4	2	4	1	7	2	3	1	9	4	6	3
PD13A DCC-interacting protein 13-alpha GN=App11	Q8K3H0	79 kDa	5	0	3	0	5	0	6	0	0	0	2	0
AP2A1 AP-2 complex subunit alpha-1 GN=Ap2a1	P17426	108 kDa	70	94	64	83	76	76	70	86	65	80	67	78
AP2A2 AP-2 complex subunit alpha-2 GN=Ap2a2	P17427 (+3)	104 kDa	46	42	33	45	35	40	36	37	37	37	28	35
AP3B2 AP-3 complex subunit beta-2 GN=Ap3b2	Q9JME5	119 kDa	7	43	15	34	11	29	11	27	9	32	7	29
AP1B1 AP-1 complex subunit beta-1 GN=Ap1b1	Q35643 (+2)	104 kDa	13	28	13	18	12	18	6	19	10	19	12	17
AP251 AP-2 complex subunit sigma GN=Ap2s1	P62743	17 kDa	4	13	11	11	9	16	8	11	8	14	9	15
AP2M1 AP-2 complex subunit mu GN=Ap2m1	P84091 (+1)	50 kDa	12	0	10	0	10	0	10	0	6	0	8	0
AP1G1 AP-1 complex subunit gamma-1 GN=Ap1g1	P22892 (+2)	91 kDa	12	2	6	2	7	0	8	6	2	0	9	3
AP3D1 AP-3 complex subunit delta-1 GN=Ap3d1	Q54774 (+4)	135 kDa	2	9	5	0	7	0	6	0	10	2	7	0
AP3M2 AP-3 complex subunit mu-2 GN=Ap3m2	Q8R2R9	47 kDa	0	5	0	5	0	2	1	2	0	2	0	4
AP151 AP-1 complex subunit sigma-1A GN=Ap1s1	P61967	19 kDa	2	1	4	0	2	2	4	0	5	0	3	0
AP1M1 AP-1 complex subunit mu-1 GN=Ap1m1	P35585	49 kDa	5	0	4	0	5	0	5	0	3	0	0	0
AP351 AP-3 complex subunit sigma-1 GN=Ap3s1	Q9DCR2	22 kDa	0	2	2	2	0	5	0	2	3	0	0	2
Section 12. Selected proteins														
NS2A_CVHOC Non-structural protein 2a OS=Human coronavirus OC43	Q80872	32 kDa	0	2	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0
Apolipoprotein E GN=ApoE	P08226 (+3)	36 kDa	4	3	3	2	3	3	2	0	4	0	2	0
Clusterin GN=Cltu	Q06890	52 kDa	4	2	6	0	5	3	3	4	2	4	4	3
High density lipoprotein binding protein GN=Hdlbp	P351M8	142 kDa	7	15	8	15	7	12	5	10	6	13	5	9
Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein GN=Lrpap1	P55302 (+7)	42 kDa	0	0	2	1	0	2	0	0	2	0	0	2

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1			region 2			region 3			region 4			region 5			region 6		
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43		
PICALM GN=Picalm	Q3TD51 (+2)	65 kDa	4	6	3	5	3	0	6	3	0	6	3	0	6	3	0	6	3	
B7ZNJ3 Caskin1 protein GN=Caskin1	B7ZNJ3 (+1)	143 kDa	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AMPH Amphiphysin GN=Amph	Q7TQF7	75 kDa	32	25	37	23	36	28	25	38	29	30	42	1	3	0	0	0	0	
SNUT2 U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2 GN=Usp39	Q3TIX9	65 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Q3UL43 Putative uncharacterized protein GN=Nup155	Q3UL43 (+3)	150 kDa	0	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Q9DCE9 Interferon gamma induced GTPase GN=Irgp	Q9DCE9	48 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CANB1 Calcineurin subunit 8 type 1 GN=Ppp3r1	Q63810	19 kDa	0	2	3	3	0	0	2	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0	
B1AQF4 Dual specificity phosphatase 3 (Vaccinia virus phosphatase VH1-related)	B1AQF4 (+1)	23 kDa	3	0	5	2	0	0	2	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	
GN=Dusp3	Q6PAM0	30 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AAKB2 5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2 GN=Prkab2	B1AZ43	57 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	
B1AZ43 Brain-specific anglogenesis inhibitor 1--associated protein 2 GN=Baiap2	B1AZ43 (+4)	57 kDa	0	8	8	5	7	8	6	4	7	3	7	6	7	6	7	6	7	
CDK5 Cell division protein kinase 5 GN=Cdk5	P49615	33 kDa	9	8	8	5	7	8	6	4	7	3	7	6	7	6	7	6	7	
IFIH1 Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1 GN=Ifih1	Q8RSF7	116 kDa	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
IFI44 Interferon-induced protein 44 GN=Ifi44	Q8BV66	48 kDa	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
TTYH1 Protein tweety homolog 1 GN=Ttyh1	Q9DJ3A9	49 kDa	5	0	2	0	0	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
B1AT19 Growth arrest speciffic factor 7 GN=Gas7	B1AT19 (+4)	47 kDa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PRP19 Pre-mRNA-processing factor 19 GN=Prpf19	Q99KP6	55 kDa	19	28	16	33	17	28	36	22	29	16	26	0	0	0	0	0	0	
B2RUN6 PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (Yeast) GN=Prpf4b	B2RUN6	117 kDa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
IF4A3 Eukaryotic initiation factor 4A-III GN=EIF4a3	Q91VC3	47 kDa	0	3	0	3	0	3	2	4	0	2	0	0	2	0	0	0	0	
IF4A2 Eukaryotic initiation factor 4A-II GN=EIF4a2	P10630	46 kDa	0	0	0	0	2	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
CCNY cyclin-Y GN=Ccnv	Q8BGU5	39 kDa	2	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CYBP Calcyclin-binding protein GN=Cacybp	Q9CWX3	27 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
THOP1 Thimet oligopeptidase GN=Thop1	Q8CIA5	78 kDa	5	0	4	0	3	0	7	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	
CIRBP Cold-inducible RNA-binding protein GN=Cirbp	P60824	19 kDa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
KHDR3 KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	Q9R226	39 kDa	0	1	0	2	0	3	0	1	6	1	3	0	0	0	0	0	0	
GN=Khdrb3	Q922V4	57 kDa	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLRG1 Pleiotropic regulator 1 GN=Plrg1	Q3U1G0	36 kDa	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Q3U1G0 Putative uncharacterized protein GN=Ev151	A2AEW8	96 kDa	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0	
A2AEW8 GRIP1 associated protein 1 GN=Gripap1	Q8VVE70	25 kDa	0	0	2	2	0	2	0	0	2	0	0	3	2	0	0	0	0	
PDC10 Programmed cell death protein 10 GN=Pdcd10	B8JLJ8 (+3)	97 kDa	2	0	1	0	5	0	4	0	3	0	4	0	4	0	0	0	0	
B8JLJ8 Programmed cell death 6 interacting protein GN=Pdc61p	Q3U661 (+3)	66 kDa	0	3	0	3	0	4	2	5	0	2	0	2	0	0	0	0	0	
Q3U661 High mobility group box family member 4 GN=Tox4	Q54983	34 kDa	13	8	8	7	7	6	12	6	6	5	6	4	6	4	6	4	6	
CRYM Mu-crystallin homolog GN=Crym	Q80XR3 (+1)	35 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Q80XR3 Crystallin, zeta GN=CRYZ	B1ATS3 (+1)	129 kDa	2	5	1	8	2	4	1	9	3	3	0	0	0	0	0	0	0	
B1ATS3 Ankyrin repeat and FYVE domain containing 1 GN=Ankfy1	Q62083 (+2)	47 kDa	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PICK1 PRKCA-binding protein GN=Pick1	A2ASQ2 (+1)	43 kDa	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A2ASQ2 Prostaglandin E synthase 2 GN=Ptges2	A2ASQ2 (+1)	43 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Section 13. Neurodegenerative associated proteins																				
A2ASV6 Microtubule-associated protein GN=Hapt	A2ASV6 (+4)	78 kDa	0	2	1	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
P12023 Amyloid beta A4 protein GN=App	P12023 (+5)	87 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Q55042 SYUA Alpha-synuclein GN=Snca	Q55042	14 kDa	10	6	9	6	9	7	6	10	9	14	0	4	0	0	0	0	0	
SYUB Beta-synuclein GN=Snbc	Q91ZZ3	14 kDa	4	2	3	0	4	4	0	3	0	4	0	3	0	0	0	0	0	
SODM Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial GN=Sod2	P09671	25 kDa	2	0	3	0	2	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	
SODC Superoxide dismutase [Cu-Zn] GN=Sod1	P08228	16 kDa	0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	
HD Huntingtin GN=Htt	P42859	345 kDa	0	2	0	3	3	0	2	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	
HYPK Huntingtin-interacting protein K GN=Hypk	Q9CR41	15 kDa	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Q3UJ14 Huntingtin-interacting protein 1--related protein GN=Hip1r	Q3UJ14 (+3)	119 kDa	8	6	11	5	11	6	8	3	2	2	6	2	2	0	0	0	0	
ATX10 Ataxin-10 GN=Atxn10	P28658 (+2)	54 kDa	6	3	4	3	5	2	5	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	
Q3U591 TAR DNA-binding 43/TDP-43 GN=Tardbp	Q3U591 (+3)	45 kDa	9	8	8	8	7	7	13	6	8	6	8	6	8	6	8	6	8	
Section 14. Kinesin family																				
KIF2A Kinesin-like protein KIF2a GN=Kif2a	P28740	80 kDa	5	7	5	8	6	6	7	8	3	8	3	8	3	8	3	8	3	
Q5UE59 Kinesin light chain-1 GN=Kic1	Q5UE59 (+2)	62 kDa	9	0	8	0	10	3	10	5	9	5	10	5	9	5	10	5	9	
KIF1A Kinesin-like protein KIF1a GN=Kif1a	P33173 (+3)	192 kDa	9	0	12	0	9	0	10	0	5	0	6	0	5	0	6	0	5	
KIFA3 Kinesin-associated protein 3 GN=Kifap3	P70188 (+1)	91 kDa	0	7	3	5	2	6	3	4	2	3	5	2	3	5	2	3	5	
KLC2 Kinesin light chain 2 GN=Klc2	Q88448 (+1)	67 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
Section 15. Dynein family														
DYHC1 Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 GN=Dync1h1	Q9JHU4	532 kDa	6	29	2	28	0	60	4	35	0	31	0	25
DYL1 Dynein light chain 1, cytoplasmic GN=Dynl1	P63168	10 kDa	4	2	5	2	5	3	3	2	4	3	3	3
DC1L1 Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1 GN=Dync1l1	Q8R1Q8	57 kDa	0	4	0	4	2	4	0	4	0	5	0	5
DYL2 Dynein light chain 2, cytoplasmic GN=Dynl2	Q9D0M5	10 kDa	1	2	2	3	2	2	0	1	2	1	2	2
A2BFF5 Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2 GN=Dync1l2	A2BFF5 (+4)	71 kDa	0	5	0	3	0	4	0	0	0	3	2	4
A2AVR9 Dynein light chain roadblock-type 1 GN=Dynlrb1	A2AVR9 (+1)	12 kDa	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Section 16. Importin family														
IMA1 Importin subunit alpha-1 GN=Kpna1	Q60960	60 kDa	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Q4G088 Importin 9 GN=Ipo9	Q4G088 (+1)	116 kDa	1	0	2	1	0	0	0	2	0	2	0	2
IMA4 Importin subunit alpha-4 GN=Kpna4	O35343 (+1)	58 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMB1 Importin subunit beta-1 GN=Kpnb1	P70168 (+3)	97 kDa	18	7	23	10	21	5	26	8	21	7	15	4
IPO7 Importin-7 GN=Ipo7	Q9EPL8	119 kDa	7	3	7	3	6	3	7	3	6	3	6	3
IPO5 Importin-5 GN=Ipo5	Q8BK55	124 kDa	7	0	13	0	7	0	7	2	5	0	6	0
IMA3 Importin subunit alpha-3 GN=Kpna3	O35344	58 kDa	0	3	0	0	3	2	3	1	0	3	0	3
IPO4 Importin-4 GN=Ipo4	Q8VI75	119 kDa	2	0	5	0	2	0	3	0	2	0	1	1
Section 17. Parp family														
B2RS13 Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14 GN=Parp14	B2RS13 (+1)	204 kDa	0	1	0	2	0	0	0	2	0	0	0	1
PARP9 Poly [ADP-ribose] polymerase 9 GN=Parp9	Q8CA59	97 kDa	0	1	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0
Section 18. Microtubule-associated proteins														
MARE2 Microtubule-associated protein RP/EB family member 2 GN=Mapre2	Q8R001	37 kDa	13	10	9	8	7	17	16	19	9	14	7	14
MAP6 Microtubule-associated protein 6 GN=Map6	Q7TSJ2	96 kDa	16	11	22	10	23	9	17	10	10	8	14	7
MARE3 Microtubule-associated protein RP/EB family member 3 GN=Mapre3	Q6PER3	32 kDa	14	3	14	4	12	6	12	5	10	8	9	6
MARE1 Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 GN=Mapre1	Q61166	30 kDa	8	5	10	3	11	5	10	7	8	5	5	3
MAP1S Microtubule-associated protein 1S GN=Map1s	Q8C052	103 kDa	3	7	2	6	3	7	4	7	2	5	2	8
B2RQ55 Microtubule-associated protein 1S GN=Map1s	B2RQ55	270 kDa	27	55	41	56	38	57	33	57	34	56	37	57
A2ARP8 Microtubule-associated protein 1B GN=Map1b	A2ARP8 (+1)	326 kDa	24	30	35	27	41	24	33	30	27	16	34	19
B2KGT6 Microtubule-associated protein 1A GN=Mtap1a	B2KGT6	199 kDa	24	11	31	4	42	10	26	10	28	8	28	7
B2RR77 Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3 GN=Mical3	B2RR77 (+2)	98 kDa	2	3	0	2	0	3	2	1	0	2	0	2
Section 19. Heat shock family														
H590A Heat shock protein HSP 90-alpha GN=Hsp90aa1	P07901	85 kDa	85	26	74	30	82	29	87	30	77	24	78	27
H512A Heat shock 70 kDa protein 12A GN=Hspa12a	Q8K0U4	75 kDa	68	50	60	44	68	43	75	52	55	41	51	36
Q71LX8 Heat shock protein 84b GN=Hsp90ab1	Q71LX8	83 kDa	37	23	46	17	41	15	42	21	44	19	33	18
HSP7C Heat shock cognate 71 kDa protein GN=Hspa8	P63017 (+3)	71 kDa	37	38	41	42	31	31	26	34	27	25	36	25
H5105 Heat shock protein 105 kDa GN=Hspb1	Q81699	96 kDa	18	2	19	4	14	2	10	4	12	2	12	2
Q3U2G2 Heat shock protein 4 GN=Hspa4	Q3U2G2	94 kDa	8	8	16	5	11	5	13	7	6	7	7	5
CH60 60 kDa heat shock protein, mitochondrial GN=Hspd1	P63038	61 kDa	10	13	7	7	10	12	7	14	9	14	8	13
H574L Heat shock 70 kDa protein 4L GN=Hspa4l	P48722	94 kDa	7	2	9	0	7	3	7	2	4	3	2	2
K1468 Lish domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468 GN=Kiaa1468	Q148V7	135 kDa	3	0	5	0	4	0	7	0	6	0	5	0
H512B Heat shock 70 kDa protein 12B GN=Hspa12b	Q9CZJ2	76 kDa	1	2	0	2	0	2	0	1	0	0	0	1
HSPB1 Heat shock protein beta-1 GN=Hspb1	P14602	23 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B7U582 Heat shock protein 70-2	B7U582 (+2)	70 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q3THQ5 Stress-induced protein 1 GN=Stip1	Q3THQ5	63 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AUX1 Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin GN=Dnajc6	Q80TQ3	102 kDa	7	0	7	0	5	0	3	2	2	1	5	0
Q3TFF0 Putative uncharacterized protein GN=Dnaj2	Q3TFF0	46 kDa	4	0	0	0	3	4	3	3	3	0	0	3
DNAJ1 DnaJ homolog subfamily A member 1 GN=Dnaj1	P63037 (+1)	45 kDa	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
A2ALF0 DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8 GN=Dnajc8	A2ALF0 (+2)	26 kDa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Section 20. 14-3-3 family														
1433E 14-3-3 protein epsilon GN=Ywhae	P62259	29 kDa	38	23	32	14	35	12	38	17	23	14	27	14

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1			region 2			region 3			region 4			region 5			region 6		
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43		
1433Z 14-3-3 protein zeta/delta GN=Ywhaz	P63101	28 kDa	40	20	32	10	33	12	30	14	25	15	22	10	38					
1433G 14-3-3 protein gamma GN=Ywhag	P61982	28 kDa	22	13	21	10	22	12	13	10	19	10	12	7	4					
1433T 14-3-3 protein theta GN=Ywhaq	P68254	28 kDa	9	3	10	6	5	5	9	4	6	6	4	7						
1433B 14-3-3 protein beta/alpha GN=Ywhab	Q9CQV8	28 kDa	13	8	10	3	6	3	9	8	8	3	7	4						
1433F 14-3-3 protein eta GN=Ywhah	P68510	28 kDa	12	4	8	3	6	6	4	6	5	4	6	2						
Section 21. HnRNP family																				
Q3TVV6 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U GN=Hnrmpu	Q3TVV6 (+3)	88 kDa	20	35	22	37	17	36	23	31	17	31	15	38						
HNRP1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L GN=Hnrnpl	Q8R081	64 kDa	8	17	13	14	7	18	12	16	28	47	9	18						
B2M1R6 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K GN=Hnrnpk	B2M1R6	49 kDa	10	19	18	19	9	19	11	15	14	13	7	15						
Q60668 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein DO GN=Hnrnpd	Q60668	38 kDa	15	15	14	9	11	12	12	12	8	12	8	17						
B7ZP22 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 GN=Hnrnpa2b1	B7ZP22 (+1)	36 kDa	5	16	9	8	2	13	2	7	8	10	7	12						
HNRH1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H GN=Hnrnp1	B7ZP22 (+1)	36 kDa	5	9	6	6	6	9	8	7	3	7	5	7						
A2AL12 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 GN=Hnrnpa3	A2AL12 (+3)	34 kDa	4	5	8	7	5	6	5	4	3	2	5	6						
Q9CX86 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 GN=Hnrnpa0	Q9CX86	31 kDa	4	3	2	3	2	7	3	6	2	6	2	3						
Q20B0D Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B GN=Hnrnpab	Q20B0D (+4)	36 kDa	2	5	3	3	3	3	4	2	3	2	3	2						
Q3UK83 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 GN=Hnrnpa1	Q3UK83	39 kDa	2	4	4	5	1	2	3	2	2	0	2	1						
Q3U6P5 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C GN=Hnrnpc	Q3U6P5 (+1)	37 kDa	0	2	0	1	0	2	0	2	0	1	0	1						
Q3U8W9 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R GN=HnrnpR	Q3U8W9	71 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
HNHR2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 GN=HnrnpH2	P70333	49 kDa	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0						
HNRPQ Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q GN=Syncrip	P70333	70 kDa	0	3	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0						
HNRLD Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like GN=Hnrpdl	Q9Z130	34 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
HNRL1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like GN=Hnrp1l	Q9Z1F4 (+1)	64 kDa	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0						
Section 22. snRNP family																				
RSMB Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B GN=Snrrpb	P27048	24 kDa	0	4	4	4	0	6	0	2	0	4	0	2						
RUXF Small nuclear ribonucleoprotein F GN=Snrrpf	P62307 (+1)	10 kDa	2	0	2	5	2	3	2	0	2	0	2	2						
SNRPA U1 small nuclear ribonucleoprotein A GN=Snrrpa	Q62189 (+1)	32 kDa	0	2	0	0	3	0	3	2	0	1	0	2						
RUXE Small nuclear ribonucleoprotein E GN=Snrrpe	P62305	11 kDa	1	4	2	4	1	4	2	2	2	0	3	2						
SMD3 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 GN=Snrrpd3	P62320 (+1)	14 kDa	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0						
SMD2 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 GN=Snrrpd2	P62317	14 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0						
SMD1 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 GN=Snrrpd1	P62315	13 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0						
SNUT2 U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2 GN=Usp39	Q3TIX9	65 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Section 23. Ubiquitin-conjugating enzyme																				
A2ATX3 Ubiquitin-conjugating enzyme E2O GN=Ube2o	A2ATX3 (+1)	141 kDa	9	0	11	0	10	0	7	0	3	0	1	0						
B7ZBY7 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 GN=Ube2v1	B7ZBY7 (+2)	19 kDa	1	0	4	0	6	0	4	0	4	0	5	0						
UBC12 NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 GN=Ube2u1	P61082	21 kDa	0	4	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0						
UBE2N Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N GN=Ube2n	P61089	17 kDa	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
UBE2Z Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z GN=Ube2z	Q3UE37	38 kDa	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0						
Section 24. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase																				
USP9X Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X GN=Usp9x	P70398 (+1)	291 kDa	10	8	9	8	10	10	11	9	6	10	9	7						
UBP5 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 GN=Usp5	P56399 (+1)	96 kDa	17	2	20	0	22	0	23	2	15	0	15	0						
UBP46 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 46 GN=Usp46	P62069	42 kDa	2	7	2	5	0	6	0	3	1	4	2	6						
UBP12 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12 GN=Usp12	Q9D9M2	43 kDa	0	3	0	3	0	2	0	0	0	2	0	2						
UBP7 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 GN=Usp7	Q6A438	128 kDa	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	0	1						
Q80UN0 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase GN=Usp14	Q80UN0	52 kDa	5	0	2	0	0	0	3	0	0	0	2	0						
UBP4 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4 GN=Usp4	P35123 (+4)	108 kDa	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
UBP10 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 GN=Usp10	P52749 (+5)	87 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Section 25. COP9 signalosome complex subunit																				
CSN6 COP9 signalosome complex subunit 6 GN=Cops6	O88545	36 kDa	4	0	4	0	3	0	3	0	3	0	4	0						
CSN4 COP9 signalosome complex subunit 4 GN=Cops4	O88544	46 kDa	1	0	2	0	4	0	2	0	3	0	0	0						
CSN3 COP9 signalosome complex subunit 3 GN=Cops3	O88543 (+1)	48 kDa	0	0	3	0	3	0	2	0	1	0	2	0						
CSN5 COP9 signalosome complex subunit 5 GN=Cops5	O35864	38 kDa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						

Identified Proteins	Acc. No.	MW	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
			ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
CSN2 COP9 signalosome complex subunit 2 GN=Cope2	P61202 (+2)	52 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Section 26. Proteasome non-ATPase regulatory subunit														
Q3TIP0 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 GN=Psmd2	Q3TIP0 (+3)	100 kDa	3	0	7	5	3	0	3	0	0	5	0	4
PSMD9 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9 GN=Psmd9	Q9CR00	25 kDa	2	2	3	3	4	4	0	2	3	2	2	2
PSMD3 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 GN=Psmd3	P14685 (+3)	61 kDa	4	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0
PSMD6 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 GN=Psmd6	Q99J14	46 kDa	2	0	1	0	0	0	2	0	0	1	1	0
Q3TG45 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 GN=Psmd8	Q3TG45 (+7)	29 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PSMD5 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 GN=Psmd5	Q8BJY1 (+1)	56 kDa	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Section 27. THOC1 THO complex subunit														
THOC1 THO complex subunit 1 GN=Thoc1	Q8R3N6	75 kDa	0	3	0	2	0	2	0	1	0	5	0	5
THOC6 THO complex subunit 6 homolog GN=Thoc6	Q5U4D9	37 kDa	0	3	0	2	0	3	0	3	0	2	0	4
THOC2 THO complex subunit 2 GN=Thoc2	B1AZI6 (+1)	183 kDa	0	0	0	3	0	2	0	2	0	3	0	2
THOC3 THO complex subunit 3 GN=Thoc3	Q8VE80	39 kDa	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
THOC7 THO complex subunit 7 homolog GN=Thoc7	Q7TMY4	24 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
THOC4 THO complex subunit 4 GN=Thoc4	O08583	27 kDa	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Section 28. Growth factors														
FGF12 Fibroblast growth factor 12 GN=Fgf12	P61329	27 kDa	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	2	3
EPH4 Ephrin type-A receptor 4	Q03137	110 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
NTKR2 BDNF/NT-3 growth factors receptor GN=Ntrk2	P15209	92 kDa	0	0	0	0	2	0	2	0	2	0	3	0

CHAPITRE IV

BINDING AND REPRESSIVE ACTIVITIES OF APOLIPOPROTEIN E3 AND E4 ISOFORMS ON THE HUMAN APOD PROMOTER

Louis-Charles Levros Jr., Maryline Labrie, Cyndia Charfi and Eric Rassart*

2012

Écris

4.1 AVANT-PROPOS

Ce projet porte principalement sur les mécanismes de régulation de l'expression génique d'*APOD* tant dans des conditions physiologiques que neuropathologiques, et cela en utilisant un modèle de souris présentant des symptômes de neurodégénérescence causés par un coronavirus humain (OC43). Cette étude permettra de caractériser les facteurs nucléaires capables de lier le promoteur d'*APOD*, provenant du cortex cérébral de souris saines ou infectées par le virus. L'étude sera menée *in vitro* dans des conditions de stress cellulaires tels que l'inflammation en présence de lipopolysaccharides (LPS) ou l'arrêt de croissance par déprivation de sérum sur des cellules de glioblastomes humains (U87). Nous avons déjà montré que dans ces conditions, l'expression génique d'*APOD* est modulée. Ainsi, suite à l'identification de ces protéines nucléaires, il s'avèrerait important de déterminer l'effet de la surexpression de ces protéines sur l'activité du promoteur d'*APOD* humain lors de ces stress cellulaires. Ces résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation du gène d'*APOD* lors de désordres neurologiques.

J'ai élaboré le design de cette étude sous la supervision du Dr Rassart. J'ai effectué la purification des protéines nucléaires liant le promoteur d'*APOD* humain par la technique de billes de streptavidines. J'ai aussi analysé les résultats de spectrométrie de masse de même que la caractérisation des protéines sélectionnées pour l'étude, c'est-à-dire le clonage des cDNA dans des vecteurs d'expression, les tests de luciférase, les tests d'ARN interférant, les tests d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), les études par immunofluorescence et microscopie confocale et l'analyse des bases de données d'hybridation *in situ* Allen Brain Atlas et le transcriptome du nouvel « *Atlas of the mouse Neocortical layers* » afin de corréler l'expression du gène d'*ApoE* avec celle d'*ApoD*. Sous ma supervision, Marylin Labrie a contribué sur les études par immunofluorescence ainsi que microscopie confocale et a contribué en partie pour les tests de ChIP. Cyndia Charfi a contribué dans l'analyse des résultats de spectrométrie de masse.

4.2 RÉSUMÉ

L'expression du gène de l'apolipoprotéine D (ApoD) est augmentée dans de nombreuses maladies neurodégénératives, dont l'Alzheimer et la sclérose en plaques. Notre équipe a déjà démontré que la surexpression du gène d'*APOD* humain dans des souris transgéniques traitées au paraquat ou encore infectées par le coronavirus OC43 qui causent une inflammation du cerveau et une neurodégénérescence confère une neuroprotection. Dans cette étude, nous avons utilisé des extraits nucléaires de souris normales ou infectées et nous avons identifié plusieurs facteurs nucléaires capables de lier le promoteur d'*APOD* *in vitro*. En particulier, nous avons détecté l'Apolipoprotéine E (ApoE). L'APOE humaine contient trois isoformes (E2, E3 et E4) avec l'E4 représentant un fort risque pour développer la maladie d'Alzheimer et l'E2, un faible risque. En effet, celle-ci se retrouvait au noyau et sur le promoteur d'*APOD* dans des cellules hépatiques et de glioblastomes. La surexpression des isoformes APOE3 et APOE4, mais pas l'APOE2, inhibe significativement l'activité du promoteur d'*APOD* dans les cellules U87 (génotype E3/E3) dans des conditions de culture normale ou de différents stress alors que l'inhibition d'*APOE* par des siRNA a l'effet contraire. En accord avec ces résultats, nous avons aussi démontré que les isoformes E3 et E4 mais pas E2 sont capables de lier le promoteur d'*APOD*. De plus, en utilisant la base de données d'hybridation *in situ* Allen Brain Atlas, nous observons une corrélation inverse entre l'expression d'*ApoD* et d'*ApoE* durant le développement, particulièrement dans le cortex, l'hippocampe, le plexus choroïde et le cervelet. Selon le transcriptome du nouvel Atlas of the mouse Neocortical layers, cette corrélation négative est aussi observée dans les couches IV à VI du cortex. Ces résultats révèlent une nouvelle fonction pour l'APOE comme régulatrice de l'expression d'*APOD*.

Mots-clés : Apolipoprotein D · Apolipoprotein E · OC43 · spectrométrie de masse · ChIP · glioblastomes astrocytaire

4.3 ABSTRACT

Apolipoprotein D (ApoD) gene expression is increased in several neurological disorders such as Alzheimer's disease (AD) and multiple sclerosis. We previously showed that transgenic mice that overexpress human APOD show a better resistance against paraquat or OC43 coronavirus-induced neurodegeneration. Here, we identified several nuclear factors from the cortex of control and OC43-infected-mice which bind a fragment of the proximal *APOD* promoter *in vitro*. Of interest, we detected Apolipoprotein E (ApoE). Human APOE consists of three isoforms (E2, E3 and E4) with the E4 and E2 alleles representing a greater and a lower risk for developing AD, respectively. Our results show that APOE is located in the nucleus and on the *APOD* promoter in human hepatic and glioblastoma cells lines. Furthermore, overexpression of APOE3 and APOE4 isoforms but not APOE2 significantly inhibited the *APOD* promoter activity in U87 cells (E3/E3 genotype) cultured under normal or different stress conditions while *APOE* knock-down by siRNA had a converse effect. Consistent with these results, we also demonstrated by ChIP assay that E3 and E4 isoforms, but not E2, bind the *APOD* promoter. Moreover, using the Allen Brain Atlas *in situ* hybridization database, we observed an inverse correlation between *ApoD* and *ApoE* mRNA expression during development and in several regions of the mouse brain, notably in the cortex, hippocampus, plexus choroid and cerebellum. This negative correlation was also observed for cortex layers IV-VI based on a new transcriptomic Atlas of the mouse Neocortical layers. These findings reveal a new function for APOE by regulating *APOD* gene expression.

Keywords: Apolipoprotein D · Apolipoprotein E · OC43 · mass spectrometry · ChIP · glioblastoma astrocytic cells

4.4 INTRODUCTION

Human Apolipoprotein D (ApoD) is a 29-kDa secreted glycoprotein and a member of the lipocalin superfamily (Drayna et al., 1987b; Flower, 1996). *ApoD* mRNA is expressed at high levels in several tissues particularly in the central nervous system (CNS) where it is produced in glia but also in scattered neurons (for review see Rassart et al., 2000). However, in contrast to other apolipoproteins such as ApoE, it is poorly expressed in liver and intestine. Moreover, its gene expression is increased in several neuropathologies such as Alzheimer's, meningoencephalitis, stroke (Terrisse et al., 1998), Parkinson's (Ordonez et al., 2006), Niemann-Pick's type C (Yoshida et al., 1996) and multiple sclerosis (Reindl et al., 2001). Furthermore, *ApoD* expression and proliferation are inversely correlated in response to cellular stress. This regulation of *ApoD* gene expression is reflected by the numerous cis elements located within its promoter (Lambert et al., 1993; Rassart et al., 2000). Several nuclear factors that bind the human *APOD* promoter under growth arrest were identified. Notably, Parp-1, Apex-1 and ERK1/2 were found to regulate *ApoD* gene expression (Levros et al., 2010). Despite several putative roles attributed to ApoD such as repair and reinnervation as well as lipid turnover after nervous tissue injury (Boyles et al., 1990a; Terrisse et al., 1999), the precise role of ApoD in the CNS remains elusive but accumulating evidences suggest a neuroprotective role as a repair protein.

ApoE is a 34 kDa secreted protein that was first identified in 1973 in association with very low density lipoprotein (VLDL) (Shore and Shore, 1973). After the liver, the brain is the second site of expression for ApoE (Mahley, 1988). Three major APOE isoforms exist in human population: APOE2, APOE3 and APOE4, thus giving rise to six different genotypes. This genetic heterogeneity of ApoE is due to amino acid composition at positions 112 and 158 (E2: cys112/cys158, E4: arg112/arg158 and E3: cys112/arg158) (Rall et al., 1982; Weisgraber et al., 1981). More importantly, ApoE is the major genetic marker associated with Alzheimer's disease, the E4 and E2 alleles representing a greater and a lower risk for developing the disease, respectively (Corder et al., 1994; Corder et al., 1993). Since both

ApoD and ApoE share common biological functions and are also implicated in neurodegenerative situations, it was of interest to investigate their respective regulation.

We previously showed that overexpression of human APOD in transgenic mice treated with paraquat or infected with OC43 coronavirus (HCoVOC43) which both provoke brain inflammation and neurodegeneration confers a neuroprotection (Do Carmo et al., 2008; Ganfornina et al., 2008). Paraquat treatment is known to generate ROS and thus protein and lipid peroxidation (Beal, 2002). HCoVOC43 are enveloped positive-stranded RNA viruses responsible for respiratory, enteric, and neurological diseases (Buchmeier and Lane, 1999; Myint et al., 1994). Indeed, HCoVOC43 has neurotropic capabilities (Arbour et al., 1999; Arbour et al., 2000; Bonavia et al., 1997), and was also found in human brains (Arbour et al., 2000). Most importantly, several studies detected the OC43 virus in subjects with multiple sclerosis (Boucher et al., 2007; Talbot et al., 2001) suggesting the involvement of a coronavirus in neurological disorders along with environmental and genetic factors (Yeh et al., 2004).

Using this mouse model of neurodegenerative disease, we identified several nuclear factors from the cortex of control and OC43-infected-mice which bind *in vitro* a DNA fragment of the human *APOD* promoter. We demonstrate that human APOE isoforms E3 and E4 but not E2 bind the *APOD* promoter *in vivo* and down regulate its gene expression. We also observed an inverse correlation between *ApoD* and *ApoE* expression in the mouse cortex using several databases. Overall, these results demonstrate a new function for APOE by regulating the *APOD* gene expression.

4.5 MATERIALS AND METHODS

4.5.1 Cell culture and reagents

Human glioblastoma cells (U87 and U373M) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, penicillin G (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml). All cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and were fed every 2 days with fresh medium.

4.5.2 Virus and mice infection

The American Type Culture Collection HCoV- OC43 strain (ATCC VR-759) was grown on the HRT-18 cell line, and virus stocks [$10^{6.5}$ TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50)/ml] were kept at -80°C as previously described (Jacomy and Talbot, 2003). Mice were infected at 22 days postnatal (DPN) with intracerebral (IC) inoculation of 10 µl containing 10 TCID₅₀ of HCoV-OC43. Control mice received an intracerebral inoculation of 10 µl of cell culture medium. Mice (C57BL/6) were killed at 7 days postinfection (DPI), and cortex was collected.

4.5.3 Nuclear extract

Briefly, 200mg of cortex of control (sham) or OC43-infected mice were homogenized in 500 µl of NE1 buffer (250 mM sucrose, 15 mM Tris-HCl pH 7,9, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20 % glycerol, 0,15 mM spermine, 0,5 mM spermidine, 1 mM DTT, 0,4 mM PMSF, 25 mM KCl and 2 mM MgCl₂). After homogeneization, 25 µl of Nonidet P-40 (Sigma Chemical) 10 % were added followed by a second step of homogeneization. Lysates were cleared by 8 min of centrifugation at 1000g. The nucleus pellet was wash with 1 mL of NE1 buffer and was resuspended in 100uL of NE2 buffer (buffer NE1 with 350 mM KCl) followed by homogeneization and centrifugation for 5 min at 12 000 g. Organelles were eliminated with a centrifugation at 180 000g for 90 min. The lysate were dialysed for 1h with buffer D (50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM K₃PO₄ pH 7,4 and 1 mM de β-mercaptoethanol) using 0,025 µm filter (Millipore) and kept at -80°C until use. All steps of the extraction

protocol were done at 4 °C. The protein concentration was determined at 595 nm using the Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

4.5.4 Affinity purification of nuclear factors and mass spectrometry

The region -817 to +64 of the human *APOD* promoter was amplified by PCR in six overlapping regions (1-6) using biotinylated primers (see supplementary Fig. 1a and b). Fragments of approximately 200pb were obtained for each region. Streptavidin beads (200 µg; Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal Biotech, Oslo, Norway) were resuspended and incubated with 6 µg of biotinylated DNA (regions 1-6) for 15 min in W&B buffer (1×) (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl and 1 mM EDTA) as recommended by the manufacturer. The washing steps were done in the same buffer and the beads linked with the biotinylated DNA were incubated for 15 min at room temperature with 100 µg of cortex nuclear extracts containing 20 µl of annealing buffer 10× (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA and 1 mM DTT), 1 mg of BSA and 20 µg of PolydI:dC in a final volume of 200 µl. The beads were washed with a low salt washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% NP-40, 1 mM EDTA and 75 mM KCl) and eluted with 60 µl of SDS 0.1%. The proteins were loaded and migrated on a SDS-PAGE (12%) followed by coomassie blue staining. Each lane was cut in fourteen distinct bands eluted, trypsinized, and analyzed by mass spectrometry (LC-MS/MS velos) at the Genome Québec Innovation Centre Proteomics Platform (Montreal, Qc, Canada) for protein identification. Proteins were identified by the presence of at least 1 distinct peptide in the sample with 99.9% probability. Of note, no differences in band intensity were observed between each regions or conditions used for purification due to the sensibility of coomassie blue staining. However, silver staining allowed to see clear differences between control or OC43 conditions for region 1 (Fig. 1c).

4.5.5 siRNA transfections

For the siRNA experiments, two pre-designed siRNA were used for human *APOE* gene. (si-apoE1 and si-apoE2; Qiagen) and negative control siRNA (Allstar negative control, Qiagen) were included in each experiment.

4.5.6 Luciferase assays

The cDNA of human *APOE* isoforms (E2; E3 and E4) were cloned in pCMV6 expression vector (Origene, Rockville, MD). Each plasmid was transiently co-transfected in U87 cells in the presence of Polyfect (Qiagen) as recommended by the manufacturer, with a vector containing the human *APOD* promoter upstream of the luciferase reporter gene (-728/+4-*apoD*-Luc). Twenty-four hours later, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline and maintained in a medium supplemented with 10% serum containing 10ug/ml lipopolysaccharide (LPS) or low-serum medium (containing 0.2% serum) or normal medium containing 10% serum. Transfected cells were lysed at different time post-transfection and luciferase activity was measured with the Dynex MLX microplate luminometer (MLX Dynex Technologies, Chantilly, VA) as already described (Do Carmo et al., 2008). Each sample was co-transfected with a β -gal-expressing vector for normalization (pcDNA-lacZ). The β -galactosidase activity was measured using the Galacto-Light™ kit (Applied Biosystems, Bedford, MS) according to manufacturer's suggestions. Luciferase activity is presented in Relative Light Units (RLU) and represents the calculated mean \pm SD of eight transfected samples normalized by the measured β -galactosidase activity.

4.5.7 Immunofluorescence and confocal microscopy

For immunofluorescence staining, U87 and U373M cells were grown on six-well plates (immunofluorescence) and Labtek chamber slides (confocal) and fixed with methanol for 30 min at -20 °C. After three washes with PBS, fixed cells were incubated in blocking (2% goat serum) for 1h. Cells were sequentially incubated with primary antibody (goat polyclonal antibody anti-APOE, 1:100; obtained from Ross Milne, Ottawa Heart Institute) and then with fluorophore-labeled secondary antibody (alexa 488). For nucleus staining, cells were incubated with propidium iodide (1:300) (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature.

4.5.8 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assay was performed on human glioblastoma U87 and hepatic HepG2 cells according to the manufacturer protocol (Zm tech Scientifique). Briefly, cells were cross-linked with 1% formaldehyde and quenched with 0.125M glycine. After sonication, chromatin was immunoprecipitated with anti-APOE polyclonal or anti-DDK monoclonal

antibodies (Origene). After several washes and DNA purification, semi-quantitative PCR was performed using specific primers for the *APOD* promoter (-397 to +64; Fig. 1b).

4.5.9 Analysis of gene expression in Allen Brain Atlas (ABA), GENSAT and The transcriptomic Atlas of the mouse Neocortical layers

The Allen Brain Atlas (ABA) (www.brain-map.org) (Lein et al., 2007) and GENSAT (www.gensat.org) (Heintz, 2004) projects are public database and useful resources to study the expression of genes in the mouse brain as well as during development. The ABA database mapped the expression of the whole mouse transcriptome (over 20,000 genes mRNA expression) by *in situ* hybridization (ISH) technique. The expression levels of ISH images are also quantified by color intensity as described in the website. The ISH images for *ApoD* and *ApoE* were selected from this database from 56 days old mice in order to compare their expression pattern in the adult mouse brain. Comparisons were also carried throughout development (from P4 to 24 months for *ApoD* and 33 months for *ApoE*) (see Fig. S1 and S2).

In the transcriptomic Atlas of the mouse Neocortical layers (<http://genserv.anat.ox.ac.uk/layers>), cortical layers were separated in sections (A-F) from somatosensory (S1), dorsal cortex (DC) and lateral cortex (LC) and in which the transcriptome was sequenced (Belgard et al., 2011). The relative expression for each genes is represented in FPKMs (fragments per kilobase of exon model per million reads mapped) values (Table 2). Sections A to F correspond to layers I-III, layer IV, upper layer V, lower layer V, layer VI and layer VIb, respectively (Belgard et al., 2011). Correlation between expression of each gene was calculated using the Pearson's correlation test.

4.5.10 Statistical analysis

Statistical significance of the experiments was evaluated using an unpaired Student's *t*-test. Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

4.6 RESULTS

4.6.1 Purification and identification of nuclear factors binding the proximal human *APOD* promoter *in vitro*

We previously showed that *ApoD* gene expression is upregulated in the brain of human OC43 virus infected mice (Do Carmo et al., 2008). In order to better understand the regulation of *APOD* gene expression, we purified the nuclear factors that bind the *APOD* promoter using nuclear extracts from the cortex of control and OC43-infected mice. Six overlapping regions of the *APOD* promoter (-816/+64) were amplified by PCR using biotinylated primers and then linked to streptavidin beads (see material and methods and Fig. 1a and b). After incubation with nuclear extracts, the specific proteins were eluted from the DNA-streptavidin complex, visualized by SDS-PAGE followed by coomassie blue staining. Protein bands were then eluted and analyzed by mass spectrometry. Because of low sensibility of Coomassie blue, silver staining was used for samples obtained from region 1 and allowed to see clear differences between control and OC43 conditions (Fig. 1c).

Several transcription factors were identified such as Stat1, Daxx, transcriptional activator Pur- α and - β , Ilf-2 and -3 (also known as Nuclear factor-45 and -90, respectively), and several members of the Hdac, Heat shock proteins, Ddx, Mapk, Importin, Dynein and Kinesin families, just to name a few (unpublished data). Proteins implicated in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's and known not only for their tendency to aggregate but also to bind DNA non-specifically (for review see Jimenez, 2010), were also purified. In particular, we detected Microtubule-associated protein tau (Mapt), Amyloid beta A4 (App), alpha- and beta-Synuclein (Snca/b), Superoxide dismutase (Sod: Cu-Zn and Mn), Huntingtin (Htt), Huntingtin-interacting protein K (HypKk), Huntingtin interacting protein related-1 (Hipr1) and Ataxin-10 (Atxn10) (unpublished data). More interestingly, we identified proteins which are not recognized in the literature to bind DNA. Of particular interest, we found Apolipoprotein E (ApoE), Clusterin (Clu, also known as ApoJ), Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein (Picalm), Bridging integrator 1 (Bin1), High density lipoprotein binding protein (Hdl-bp) and alpha-2-

macroglobulin receptor-associated protein also known as Low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1 (Lrpap1) (Table 1). Due to the novelty of ApoE binding to DNA and its association with neurodegenerative diseases, we further investigated the implication of this protein on *APOD* gene regulation. ApoE was detected in both conditions in regions 1, 2 and 3 and only in control nuclear extracts in regions 4, 5 and 6 (Table 1).

4.6.2 APOE localizes in the nucleus of U87, U373M and HepG2 cell lines

Several studies already reported the nuclear localization of APOE in different cell types such as Human foreskin fibroblast (AG01518), Chinese-Hamster Ovary (CHO) cells, ovarian cancer cells (OVAR3) and from various rat tissue cells such as brain and liver (Chen et al., 2005; Kim et al., 2008b; Panin et al., 1998; Panin et al., 2000; Quinn et al., 2004). We performed immunofluorescence and confocal microscopy to investigate the possible nuclear localization of APOE in glioblastoma astrocytic cells (U87 and U373M; Fig. 2) cultured in normal conditions. APOE was found predominantly in the cytoplasm and to a lesser extent in the nucleus in a punctate pattern. The same pattern of nuclear localization was also seen in human hepatic cells HepG2 (data not shown).

4.6.3 APOE3 and E4 bind the *APOD* promoter *in vivo*

Since APOE was found in the nucleus, we investigated its binding to DNA. The binding specificity of APOE on the *APOD* promoter was verified by ChIP assay. We found that the *APOD* promoter was immunoprecipitated by both APOE and TFIID (positive control) antibodies in U87, U373M and HepG2 cells (Fig. 3a). When overexpressing the different isoforms of APOE (E2, E3 and E4) tagged with DDK in U87 cells, we demonstrated that only E3 and E4 but not E2 could be detected on the *APOD* promoter compared to the control (empty pCMV6 vector; Fig. 3b). These results are consistent with the fact that the U87 and HepG2 cells genotype is E3/E3 (Riddell et al., 2008). However, to our knowledge, the *APOE* genotype of U373M cells is unknown.

4.6.4 APOE3 and E4 repress the *APOD* promoter activity

Since both mouse and human ApoE proteins were detected on the human *APOD* promoter by mass spectrometry analysis and ChIP assay, we next attempted to determine if APOE could regulate *APOD* expression in U87 cells under different stress conditions. Indeed, we previously demonstrated that both mouse and human ApoE gene expression is upregulated in several stress conditions such as growth arrest and inflammation in different cell lines, more precisely in human astrocytic cells (U373) and NIH/3T3 murine fibroblasts (Do Carmo et al., 2002; 2007). Therefore, U87 cells were co-transfected with the different *APOE* isoforms cDNA in pCMV6 vector and a construct containing the *APOD* promoter upstream of the luciferase reporter gene (-728/+4-apoD-pGL3). The luciferase activity was analyzed in normal (10% serum), serum-starved (0.2% serum) and inflammatory conditions (LPS; 10ug/ml). At 24h post-transfection (Fig. 4a), both APOE3 and E4 repressed the *APOD* promoter activity in normal and serum-starved conditions compared to the control (empty vector) while E2 isoform had no effect. In inflammatory conditions, the *APOD* promoter was repressed in the control, but this repression was less prominent in the presence of E2. Moreover, E4 isoform repressed the *APOD* promoter activity compared to the control, with E3 having no effect.

Furthermore, we used specific siRNA against *APOE* gene to verify if the repressive activity of E3 isoform in U87 cells could be reversed, since this cell line harbors a E3/E3 genotype. Indeed, blocking the expression of *APOE* in U87 cells for up to 48h post-transfection of specific siRNA (siApoE) (Fig. 4b), significantly transactivated the apoD promoter in all conditions tested (Fig. 4 c). These results show that APOE3 and E4 negatively regulate *APOD* gene expression.

4.6.5 *ApoD* and *ApoE* expression correlation in the mouse cortex layers

Using the FPKMs values for each genes from the transcriptomic Atlas of the mouse Neocortical layers (Table 2), we applied a Pearson's correlation test between *ApoE* and *ApoD* gene expression (Table 3). We did not observed expression correlation between *ApoE* and *ApoD* genes for sections A-F ($r=0,05$; Table 3). However, for sections B-F, the expression of

ApoD and *ApoE* is negatively correlated in dorsal cortex and lateral cortex ($r=-0.85$; $p<0.005$). This negative correlation is not observed in somatosensory S1 probably due to an upregulation of *ApoE* expression in section F which is not observed in dorsal or lateral cortex (Table 2, indicated in bold). A positive correlation between *ApoD* and *ApoE* gene expression was observed for sections A-B in somatosensory S1, dorsal and lateral cortex ($r=0.82$; $p<0.05$).

4.6.6 *ApoD* and *ApoE* expression correlation in the mouse cortex layers

Using the FPKMs values for each genes from the transcriptomic Atlas of the mouse Neocortical layers (Table 2), we applied a Pearson's correlation test between *ApoE* and *ApoD* gene expression (Table 3). We did not observed expression correlation between *ApoE* and *ApoD* genes for sections A-F ($r=0.05$; Table 3). However, for sections B-F, the expression of *ApoD* and *ApoE* is negatively correlated in dorsal cortex and lateral cortex ($r=-0.85$; $p<0.005$). This negative correlation is not observed in somatosensory S1 probably due to an upregulation of *ApoE* expression in section F which is not observed in dorsal or lateral cortex (Table 2, indicated in bold). A positive correlation between *ApoD* and *ApoE* gene expression was observed for sections A-B in somatosensory S1, dorsal and lateral cortex ($r=0.82$; $p<0.05$).

4.7 DISCUSSION

The *APOD* gene is upregulated in several neuropathological disorders such as Alzheimer's disease (AD), meningoencephalitis (Terrisse et al., 1998), multiple sclerosis (Reindl et al., 2001), and Parkinson's disease (Ordonez et al., 2006). APOD concentrations are increased by 350 and 60% in the cerebrospinal fluid (CSF) and hippocampus, respectively, of patients with AD compared with normal subjects (Terrisse et al., 1998). *ApoD* gene expression is also upregulated in the central nervous system (CNS) of mice infected with viruses, which cause encephalitis, such as HSV-1 (herpes simplex type-I virus; Kang et al., 2003b), Sindbis virus (Johnston et al., 2001), JEV (Japanese encephalitis virus; Saha and Rangarajan, 2003), rabies virus (Prosniak et al., 2001) and human coronavirus OC43 (HCoV43; Do Carmo et al., 2008). In OC43-infected mice, *ApoD* gene expression was found upregulated by five- and seven-fold in the cortex and hippocampus, respectively. Several studies have speculated a neuronal protective role for ApoD (del Valle et al., 2003; Desai et al., 2005; Franz et al., 1999; Khan et al., 2003; Navarro et al., 2008; Ordonez et al., 2006; Terrisse et al., 1999; Thomas et al., 2001) and overexpression of APOD in neurons of transgenic mice confers neuroprotection (Do Carmo et al., 2008; Ganfornina et al., 2008) and/or an improved repair potential.

The study presented herein reports the identification of several nuclear factors, from the cortex of control and OC43-infected mice, that bind the human *APOD* promoter. Among the nuclear factors identified, we were particularly interested in the ApoE DNA-binding properties mostly because these two genes share common biological features. More precisely, both ApoD and ApoE proteins vary in concentration in several neurodegenerative diseases, binds to high-density-lipoproteins (HDL) (McConathy and Alaupovic, 1976), are involved in regenerative and reinnervation in the peripheral nervous system (PNS) (Boyles et al., 1990a; Ganfornina et al., 2010). Their expression is regulated after entorhinal cortex lesioning of the rat brain (Terrisse et al., 1999) and in several stress conditions, such as growth arrest caused by serum deprivation (Do Carmo et al., 2002; Kim et al., 2008b; Provost et al., 1991a) and inflammation (Do Carmo et al., 2007). Moreover, under stress conditions, ApoD (Do Carmo

et al., 2007) and ApoE (Do Carmo et al., 2007; Kim et al., 2008b; Quinn et al., 2004) were shown to enter the nucleus. Finally, both proteins colocalize with amyloid β ($A\beta$) within senile plaques and neurofibrillary tangles of AD brain tissue (Desai et al., 2005; Kalman et al., 2000; Navarro et al., 2003).

Using streptavidin beads and biotinylated PCR-amplified DNA complex, we showed that ApoE binds to all six regions of the *apoD* promoter from nuclear extracts obtained from the cortex of either control or OC43 infected-mice (Table 1). This results shows that ApoE may be constitutively bound on the *APOD* promoter in both normal and pathological conditions and demonstrate for the first time a DNA-binding activity for ApoE. Since ApoE does not contain any DNA-binding domain or NLS, we speculate that it binds the *APOD* promoter by interaction with another nuclear protein. Despite this fact, APOE nuclear localization has already been demonstrated in several cell types and tissues, including brain and liver (Chen et al., 2005; Kim et al., 2008b; Panin et al., 1998; Panin et al., 2000). Here, we confirm that APOE is localized to the nucleus of human hepatic and glioblastoma cells (Fig. 2) and we clearly demonstrate by ChIP assays that E3 and E4 isoforms, but not E2, could bind the *APOD* promoter *in vivo* (Fig. 3).

The mechanism by which APOE may escape the secretory or endocytic pathways and be directed to the nucleus is still obscure. It is quite possible that APOE enters the cytoplasm through interaction with cellular receptors such as low density lipoprotein receptor (LDLR) or LDLr-related family members (LRP) and once inside the cytoplasm could migrate to the nucleus via importins or nucleolin (Semenkovich et al., 1990; Shibata et al., 2002). We did not identify any known ApoE binding receptors among those factors binding the *apoD* promoter but several functional related ApoE proteins were identified such as Lrpap1, ApoJ and Hdl-bp (Table 1). Interestingly, ApoJ is also implicated in several aspects of AD. Effectively, its gene expression is induced in AD (May et al., 1990) and plays pleiotropic functions such as removal of amyloid- β peptides and fibrils, brain cholesterol and lipid homeostasis in association with ApoE (for review see Nuutinen et al., 2009). Moreover, ApoJ is localized in the nucleus in complex with Ku70, a DNA binding subunit of DNA-

dependent protein kinase (DNA-PK) (Yang et al., 2000). Also, several genome-wide association studies (GWAS) have identified and associated PICALM, BIN1 and CLU genetic polymorphisms with AD (for review see Lambert and Amouyel, 2011), which were all found on the *APOD* promoter. PICALM and BIN1 are both associated with clathrin endocytic pathways (Hollingworth et al., 2011; Pant et al., 2009).

Despite the fact that several studies have clearly demonstrated the presence of APOE in the nucleus, its underlying role in this organelle remains unclear. It was speculated that ApoE could play a role in transcriptional activity (Panin et al., 2000; Quinn et al., 2004; Zhao et al., 2011). In this present work, we clearly demonstrated that APOE is implicated directly at the promoter level in gene transcription regulation. Indeed, overexpression of E3 and E4 isoforms significantly inhibited the *APOD* promoter in normal and serum-starved conditions 24h post-transfection while E2 had no effect (Fig. 4a). Unexpectedly, in inflammatory conditions, the *APOD* promoter appeared repressed in contradiction with previous findings (Do Carmo et al., 2007). This apparent discrepancy is very likely due to the incubation time used (24h in this study versus 3-6 days). Moreover, *ApoE* gene expression is upregulated by LPS in astrocytes and monocytes but repressed in macrophages (Gafencu et al., 2007). Therefore, inhibition of *APOD* promoter activity in presence of LPS may be due to endogenous induction of APOE gene in U87 cells. Also specific siRNA directed against *APOE* gene relieved the *APOD* promoter from repression (Fig. 4c). In this experiment, only the *APOE3* isoform could be targeted with a specific siRNA due to the E3/E3 genotype of U87 cells (Riddell et al., 2008). Since a neuroprotective role for APOD has been proposed, the fact that the E4 and E2 alleles represent a greater and a lower risk for developing AD, respectively is in agreement with our results of the effect of these isoforms on the apoD promoter activity. In contrast, the repressive activity of E3 isoform on the *APOD* promoter does not correlate well with APOD neuroprotective role since the E3 allele is considered more beneficial than E4 in AD. Considering the clearly established neuroprotective role of APOD, it is tempting to speculate that the neuroprotective action of APOE2 is due to the fact that it does not inhibit *APOD* expression. It would be interesting to further investigate this mechanism of regulation of the *APOD* promoter by APOE isoforms using glioblastoma cell

lines with different *APOE* genotype (E2/E2 and E4/E4) and also using knock-in mice for each human apoE isoforms. Such experiments will clearly clarify the overall picture regarding the role of each APOE isoforms on *APOD* gene regulation.

In human brain, *APOD* gene regulation is positively correlated with age at the opposite for *APOE* (Belloir et al., 2001; Elliott et al., 2010; Kalman et al., 2000; Kim et al., 2009; Navarro et al., 2010). Interestingly, it was demonstrated that the increase of APOD and decrease of APOE concentrations in the CSF and brain respectively of AD patients are correlated in a dose-dependent manner with inheritance of the E4 allele (Bertrand et al., 1995; Leduc et al., 2011; Riddell et al., 2008; Terrisse et al., 1998). This correlation is also observed in the cortex, cerebellum and hippocampus of apoE-KO mice where ApoD protein expression is increased (Jansen et al., 2009; Terrisse et al., 1998). Also, the expression of ApoD and ApoE genes is differentially modulated in rats hippocampus 4 days after entorhinal cortex lesioning where ApoD is upregulated ipsilaterally and ApoE downregulated bilaterally (Terrisse et al., 1998). Perdomo and Henry Dong (2009) also reported an increase of ApoD plasma levels in a mouse model of atherosclerosis using 3 months old ApoE-KO mice.

Based on the ABA database, we observed qualitatively that *ApoD* and *ApoE* mRNA expression are inversely correlated in the mouse cortex during development (Fig. S1), and also in several brain regions of 56 days old mice (Fig. S2). Effectively, *ApoE* mRNA appears strongly expressed in the cortex, hippocampus and plexus choroid (Fig. S2b-d) in contrast to *ApoD* gene expression. Furthermore, this inverse correlation was also observed in a transcriptomic atlas of the mouse brain neocortex for layers IV-VI corresponding to section B-F (Table 3). However, a positive correlation was shown in cortex layers I-IV corresponding to section A-B which is apparently attributable to higher *ApoD* expression in sample A relative to sample B (Table 3). *In situ* hybridization data from the ABA database in developing brain (Fig. S1) and previous work suggest that *ApoD* mRNA, like *ApoE*, is expressed in the pia mater of the subarachnoid space in monkey and rabbit brain (Provost et al., 1991b; Smith et al., 1990), some of which could have been swept into the dissection of

section A. These cells and the perivascular fibroblasts of the subarachnoidal space derive from different lineages. It is thus possible that, in those particular cell lineages such a negative regulatory relationship is overpowered by other transcription factors. The significant negative correlation seen elsewhere (sample B-F corresponding to cortex layers IV-VI) is certainly consistent with our experimental findings of a negative regulatory relationship in glia. However, the cell-type specificities of *ApoE* and *ApoD* could be an alternative explanation. Indeed, the expression profile of *ApoE* is quite similar to the expression profile of many astrocyte-specific genes while the expression profile of *ApoD* is similar to the expression profile of many oligodendrocyte-specific genes (Cahoy et al., 2008).

In conclusion, several proteins were identified that bind the *APOD* promoter *in vitro* from a mouse model of acute encephalitis induced upon infection by the human OC43 coronavirus. Our results demonstrate a novel function for APOE through binding and regulating the *APOD* promoter. We also observe an inverse correlation between the *ApoE* and *ApoD* gene expression in most regions of the mouse brain as well as during development. This inverse correlation certainly requires further investigations. Moreover, APOE could, as a potential transcription factor, be involved in several neuropathological disorders.

4.8 ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge support from the Canadian Institutes for Health Research to ER (Grant MOP-15677). We thank Sonia Do Carmo and Grant Belgard for helpful discussion.

Table 4.1. Selected identified proteins from the mass spectrometry analysis binding the *APOD* promoter. Nuclear extracts from the cortex of control (ctrl) or OC43-infected mice were incubated with six overlapping regions (1-6) of the *APOD* promoter (approx. 200pb for each region) bound to streptavidin beads. The bound proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE and silver staining. Each well was cut in 14 distinct bands, eluted and analyzed by mass-spectrometry analysis (LC-MSMS velos) after tryptic digestion. For each region, the number of peptides which allowed protein identification are indicated. MW, Molecular Weight. Unless indicated with *, all proteins were identified with peptides with minimum 99.9% probability.

Protein ID	Acc. No	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
		ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
ApoE	P08226	4	3	3	2	3	3	2	0	4	0	2	0
Clu/apoJ	Q06890	4	2	6	0	5	3	3	4	2	4	4	3
HDL-BP	Q3V1M8	7	15	8	15	7	12	5	10	6	13	5	9
LRPAP1*	Q3V1M8	0	0	2	1	0	2	0	0	2	0	0	2
BIN1	O08539	33	26	20	25	28	27	31	24	26	29	28	22
PICALM	Q3TD51	4	6	3	5	5	3	0	6	3	6	2	5

Table 4.2. FPKMs values for *ApoD* and *ApoE* genes. The FPKMs values were obtained from (Belgard et al., 2011). FPKMs values for *ApoD* and *ApoE* in the six sections layers (A-F; from superficial to deep layers) of somatosensory cortex (S1), dorsal and lateral cortex (DC; LC). For somatosensory cortex (S1), section B was done in duplicate.

		FPKM (fragments per kilobase of exon model per million reads mapped)							
Gene	GENE ID								
		SOMATOSENSORY CORTEX	A	B1	B2	C	D	E	F
<i>ApoD</i>	ENSMUSG000000002985		78,5686	20,2918	33,3066	46,2856	58,6014	101,871	293,871
<i>ApoE</i>	ENSMUSG000000002985		1484,84	897,763	664,742	563,017	507,324	423,845	750,515
		DORSAL CORTEX	DCA	DCB		DCC	DCD	DCE	DCF
<i>ApoD</i>	ENSMUSG000000002985		169,173	43,2737		67,7391	110,61	164,592	273,522
<i>ApoE</i>	ENSMUSG000000002985		3392,72	2709,79		2471,74	2103,72	1879,52	824,348
		LATERAL CORTEX	LCA	LCB		LCC	LCD	LCE	LCF
<i>ApoD</i>	ENSMUSG000000002985		150,411	96,6178		107,019	113,292	174,006	181,347
<i>ApoE</i>	ENSMUSG000000002985		4637,85	3191,89		2196,49	1668,19	1826,03	1501,04

Table 4.3. Pearson's correlation of *ApoE* expression compared with *ApoD* gene expression. Pearson's correlation was calculated from FPKMs values shown in Table S3. In column « S1-DC-LC (A-F) », the coefficient correlation values were calculated for all samples (A-F) in somatosensory (S1), Dorsal cortex (DC) and Lateral cortex (LC). In column « S1-DC-LC (A-B) », the coefficient correlation values were calculated only for samples (A-B). In the last column « DC-LC (B-F) », the coefficient values were calculated for samples (B-F) in Dorsal and Lateral cortex. ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.005.

Protein	GENE ID	Pearson's coefficient correlation		
		S1-DC-LC (A-F)	DC-LC (A-B)	DC-LC (B-F)
ApoE	ENSMUSG00000002985	0,05	0,82 ^a	-0,85 ^c

4.9 FIGURE LEGENDS

Figure 4.1. Sequence of the proximal *APOD* promoter and biotinylated primers used for amplification of smaller overlapping regions. A) Schematic representation of the 5' flanking region of the *APOD* promoter (-828/+64) showing several known responsive elements (Lambert et al, 1993; Do Carmo et al., 2002) and the positions of the primers (indicated with arrows of different colors). Six overlapping regions ((1-6) of the *APOD* promoter were amplified by PCR. B) Nucleotide sequence of the primers with their respective positions on the *APOD* promoter. C) Silver stained SDS-PAGE showing differences in band intensity between control and OC43 nuclear extracts. Proteins were eluted from region 1.

Figure 4.2. Analysis of cellular localization of APOE in U87 and U373 cells. Cells were grown at approximately 50% confluence, fixed and immunostained using a specific APOE antibody and Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (green fluorescence). The nucleus was stained with Propidium Iodine (PI; red fluorescence) and cells were observed by immunofluorescence A) and confocal microscopy B).

Figure 4.3. APOE interacts with the *APOD* promoter *in vivo*. A) Human hepatic (HepG2) and glioblastoma (U87; U373) cells were collected for chromatin immunoprecipitation assays. The input and chromatin immunoprecipitation products were amplified by PCR reactions corresponding to the region -397 to +64 of the *APOD* promoter. The input represents 10% of the cell lysate. Mock, no antibody; α -TFIID, positive control; α -IgG (secondary goat), negative control. B) U87 cells transfected with *APOE* cDNA isoforms tagged with DDK and treated as in A).

Figure 4.4. Regulation of the *APOD* promoter by APOE isoforms. Human glioblastoma U87 cells were co-transfected with vectors containing a luciferase reporter construct under the 5'-flanking region (-728/-4) of the *APOD* promoter gene, the cDNA corresponding to the three *APOE* isoforms (E2; E3 and E4), the plasmid pcDNA-LacZ and the control (CTRL-) corresponding to the empty vector. After transfection, cells were cultured in media with

serum (10%) or without serum (0.2%) or with Lipopolysaccharide (LPS: 10ug/ml) for 24h A). Western blot analysis of APOE in cells transfected by specific siRNA at different concentrations to document expression inhibition B). Effect of specific siRNA against *APOE* (siApoE; dark grey bars) or non-specific siRNA (ns-siRNA; negative control) on the *APOD* promoter activity 48h post-transfection D).

Figure 4.2

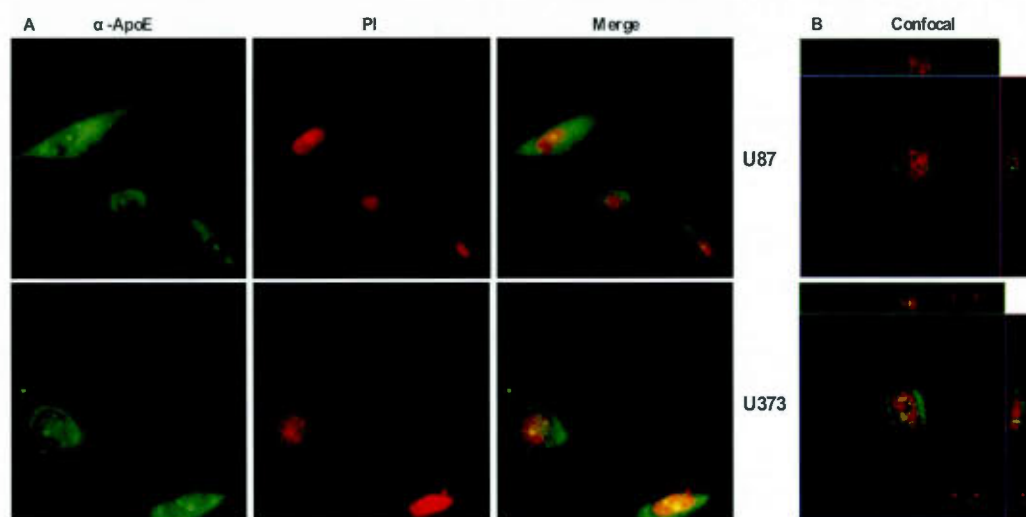


Figure 4.3

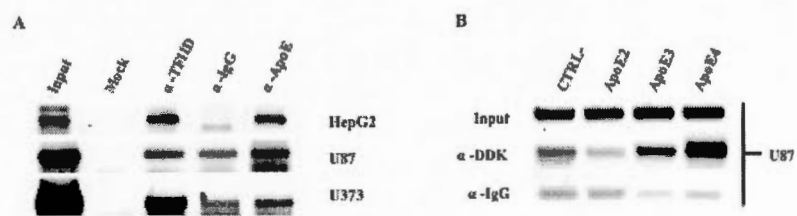
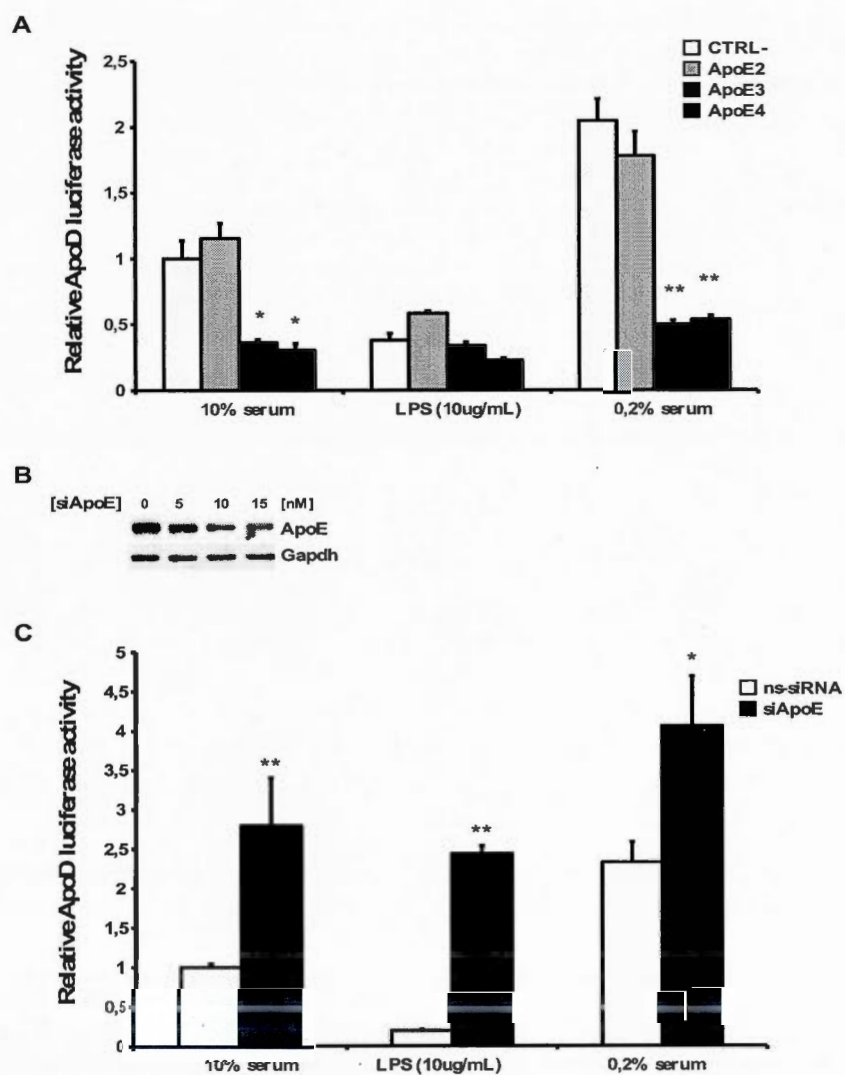


Figure 4.4



4.10 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure 4.1S. Representative *in situ* hybridizations of *ApoD* and *ApoE* genes in the mouse cortex during development. These images were obtained from the ABA website (<http://www.brain-map.org>) with their corresponding relative gene expression intensities. Comparisons were made throughout development, from E.18.5 to 24 months for *ApoD* and 33 months for *ApoE*.

Figure 4.2S. Representative *in situ* hybridizations of *ApoD* and *ApoE* genes in the mouse brain. These images were obtained from the ABA web site (<http://www.brain-map.org>) with their corresponding relative gene expression intensities in different brain areas of 56 day old mice. A) Total brain. B) Hippocampus. Field CA1; CA2; CA3; DG, dentate gyrus. C) Cerebral cortex (isocortex). Layers I-VI; CC, corpus collasum. D) Plexus choroid. E) Cerebellar cortex. ML, molecular layer; PL, Purkinge layer; GL, granular layer.

Figure S4.1

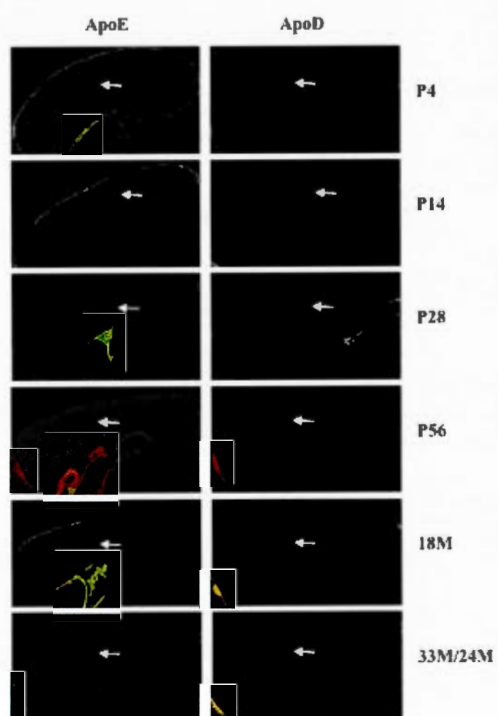
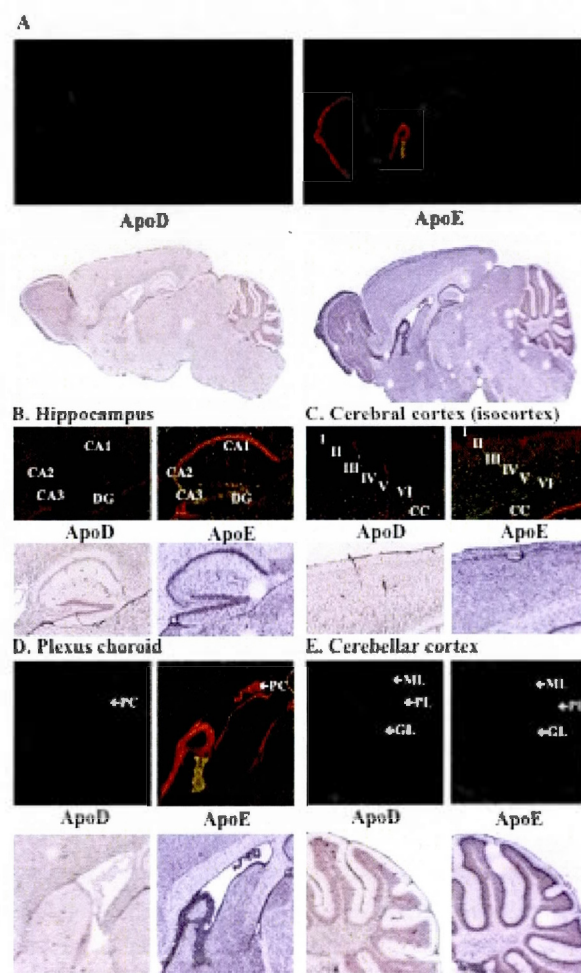


Figure S4.2



CHAPITRE V

THE CORONAVIRUS OC43 NON-STRUCTURAL PROTEIN NS2 BINDS AND TRANSACTIVATE THE APOLIPOPROTEIN D PROMOTER

Louis-Charles Levros Jr., Hélène Jacomy, Marc Desforges, Pierre Talbot and Eric Rassart*

2012

Écris

5.1 AVANT-PROPOS

Parmi les nombreuses protéines nucléaires liant le promoteur d'*APOD* dans un modèle murin d'encéphalite aigüe, nous avons identifié la protéine Ns2 (« *Non-structural protein 2* ») du coronavirus humain OC43 (HCoVOC43). Dans le chapitre III, nous montrons que cette protéine virale lie plusieurs régions du promoteur d'*APOD*, régions contenant des éléments de réponses en commun. Effectivement, les régions 1, 3 et 4 (liées par Ns2) contiennent toutes des éléments de réponses ERE (« *Estrogen Responsive Element* ») et APRE (« *Acute Phase Responsive Element* »). De plus, dans la littérature, cette protéine est très peu caractérisée et sa fonction demeure toujours inconnue. Sachant que l'*APOD* joue un rôle neuroprotecteur dans ce modèle de neurodégénérescence, nous avons vérifié si cette protéine pouvait réguler le promoteur d'*APOD*.

Notre équipe a aussi démontré que ce rôle neuroprotecteur d'*APOD* semble être étroitement lié à sa capacité à réguler plusieurs processus inflammatoires. Nous avons donc analysé l'expression de plusieurs protéines impliquées dans l'inflammation, particulièrement dans les maladies neurodégénératives. L'une des approches thérapeutiques très prometteuses est celle ciblant l'activation du facteur de transcription PPAR γ . Celui-ci joue un rôle central dans la neuroinflammation et des ligands synthétiques activant cette protéine se sont révélés bénéfiques dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives chez la souris et aussi dans des essais cliniques chez des patients atteints d'Alzheimer. Effectivement, PPAR γ joue un rôle important dans la voie du cholestérol elle-même impliquée dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Elle activerait l'expression de gènes anti-inflammatoires et réprimerait les gènes pro-inflammatoires par l'intermédiaire de voies de signalisation impliquant NF- κ B, ERK1/2, STAT1/3 et COX-2. De la même manière, l'emploi de molécules activant la protéine AMPK fait l'objet d'intenses études qui montrent aussi des effets bénéfiques contre ces maladies.

Nous avons aussi regardé l'expression de la protéine Ido (« *indoleamine-2,3-dioxygenase* »), connue pour jouer un rôle important dans les maladies auto-immunitaires

telles que la sclérose en plaques. L'expression de cette protéine est induite en présence de cytokines (interféron- α et γ) secrétées par les cellules-T lors d'inflammation chronique. L'activité enzymatique de cette protéine, qui dégrade le tryptophane, supprimerait la réponse immunitaire des cellules T-spécifiques d'antigènes et activerait les cellules T régulatrices (suppresseur). L'induction de cette protéine dans plusieurs modèles murins de maladies auto-immunes telles que l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE « *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* ») démontre qu'elle joue aussi un rôle bénéfique. De plus, ce mécanisme d'immunotolérance survient naturellement lors de la grossesse chez les mammifères. L'IDO inhiberait les réponses immunitaires médiées par les cellules-T contre les antigènes foetaux hérités du père. De la même manière, les femmes enceintes atteintes de sclérose en plaques voient leurs symptômes disparaître par le même processus d'immunotolérance régulé par l'enzyme IDO.

L'analyse de ces protéines clefs impliquées dans l'inflammation a été faite à partir de cortex de souris de type sauvages (WT) et transgéniques pour le gène humain d'*APOD* (Tg-apoD) et infectées ou non par le coronavirus OC43. J'ai élaboré le design de cette étude et effectué les analyses par immunobuvardage et RT-PCR concernant l'expression des différents gènes de même que les tests de luciférase. La Dre Hélène Jacomy a effectué les injections de virus OC43 dans les souris et effectué le suivi des animaux. Elle a aussi prélevé les différents tissus cérébraux de souris. Le Dr Marc Desforges a construit le virus mutant déficient en protéine Ns2 (OC43delNs2) et le Dr Pierre Talbot a supervisé les travaux effectués à l'Institut Armand Frappier.

5.2 RÉSUMÉ

Nous avons démontré précédemment que la surexpression de l'apolipoprotéine D (ApoD) dans des souris transgéniques confère une neuroprotection contre le coronavirus humain OC43 (HCoVOC43) en régulant les processus inflammatoires dans le cerveau. Nous avons aussi identifié plusieurs facteurs nucléaires capables de lier le promoteur du gène dans un modèle de souris atteintes d'encéphalite aiguë et, parmi ces facteurs, nous avons purifié la protéine non-structurale Ns2 du coronavirus OC43. Dans la présente étude, nous démontrons que la surexpression du gène Ns2 transactive le promoteur d'*APOD* dans des cellules NIH/3T3. L'injection intracérébrale d'un virus mutant déficient en protéine Ns2 (OC43delNs2), contrairement au virus de type sauvage, ne provoque pas une induction aussi forte d'ApoD dans plusieurs régions du cerveau. De plus, nous montrons que les protéines Nf-kb (p50), Ppar- γ et l'indoleamine-2,3-dioxygénase (Ido) sont réprimées dans le cortex de souris infectées par rapport aux souris contrôles. Par contre, ces protéines sont fortement induites chez nos souris transgéniques pour le gène d'*APOD* humaine. Erk1/2 et Stat-3 sont activées chez les souris infectées, transgéniques ou non. Fait intéressant, la phosphorylation d'Ampk est induite dans les souris transgéniques infectées. Suite à l'infection, l'expression des gènes *Stat-1* et *Cox-2* est augmentée dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet de souris de type sauvage alors que l'expression de Stat-3 n'est modulée que dans le cervelet. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent une fonction pour la protéine Ns2 du coronavirus humain OC43 dans sa capacité à lier le promoteur d'*APOD* et de réguler son expression à la hausse. Nous présumons donc que l'effet neuroprotecteur de l'APOD s'exerce par l'entremise de divers facteurs clés reliés à l'inflammation et impliqués dans les maladies neurodégénératives.

Mots-clés : apolipoprotéine D (ApoD), OC43, encéphalite aiguë, protéine non-structurale Ns2 (Ns2), inflammation.

5.3 ABSTRACT

We previously demonstrated that overexpression of apolipoprotein D (ApoD) in transgenic mice confers neuroprotection against human coronavirus OC43 (HCoVOC43) by regulating inflammatory process in the brain. We also identified several nuclear factors that bind the human *APOD* promoter in this mouse model of acute encephalitis using several overlapping promoter regions as bait. Among these nuclear factors, we purified the Non-structural protein 2 (Ns2) of the coronavirus OC43. In the present study, we show that overexpression of Ns2 gene transactivates the *APOD* promoter in NIH/3T3 cells. Also, intracerebral inoculation of an OC43 virus mutated in the Ns2 gene (OC43delNs2) does not show ApoD protein induction in several regions of the mouse brain as high as for the wild-type OC43 virus. Furthermore, we show that Nf- κ b (p50), Ppar- γ and indoleamine-2,3-dioxygenase (Ido) proteins are repressed in the cortex of infected mice compared to controls. However, these proteins are strongly induced in infected mice transgenic for the human *APOD* gene. Both Erk1/2 and Stat-3 are activated in infected wild-type and transgenic mice. Interestingly, Ampk phosphorylation is induced in infected transgenic mice. Upon infection, both *Stat-1* and *Cox-2* gene expression are upregulated in the cortex, hippocampus and cerebellum of wild-type mice, whereas *Stat-3* was only induced in the cerebellum. All together, these results describe a new function for the OC43 Ns2 protein in its ability to bind and upregulate the *ApoD* gene expression *in vivo*. We speculate that APOD neuroprotective role may be through regulation of key inflammatory factors implicated in neurodegenerative diseases.

Keywords: apolipoprotein D (ApoD), OC43, acute encephalitis, Non-structural protein 2 (Ns2), inflammation.

5.4 INTRODUCTION

Human coronaviruses (HCoV) are enveloped positive-stranded RNA viruses responsible for respiratory infections (for review see Chauhan et al., 2008) that have been associated with gastrointestinal (Myint et al., 1994) and neurological disorders such as multiple sclerosis (Vabret et al., 2003). The two prototype strains of HCoV are HCoV229E (Hamre and Procknow, 1966) and HCoVOC43 (Boucher et al., 2007; Burks et al., 1980; Cristallo et al., 1997; Murray et al., 1992; Salmi et al., 1982; Stewart et al., 1992; Talbot et al., 2001) and contain four structural proteins: spike (S), membrane (M), Haemagglutinin-esterase (HE) and nucleocapsid (N) (McIntosh et al., 1967a; McIntosh et al., 1967b). The HCoVOC43 also harbors several open reading frames (ORF) which encode non-structural proteins including the Ns2 protein (ORF2) (Mounir et al., 1993). However, its putative role remains unknown. C57BL/6 mice infected with HCoVOC43 show signs of acute encephalitis with neurons vacuolation and degeneration by both necrotic and apoptotic death (Labonte et al., 1995; Mounir et al., 1993).

APOD is a lipocalin family member that transports small hydrophobic molecules such as some steroid molecules, bilirubin and arachidonic acid (AA) (Jacomy et al., 2006; Jacomy and Talbot, 2003). APOD is upregulated in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer, Parkinson and multiple sclerosis (Ordonez et al., 2006; Rassart et al., 2000; Reindl et al., 2001; Terrisse et al., 1998). We showed earlier that *ApoD*/*ApoD* transcript and protein are upregulated in the brain of OC43-infected mice (Rassart et al., 2000). More importantly, OC43-infected mice transgenic (Tg) for the human *APOD* gene have a better survival rate compare to their wild-type (WT) littermates. This correlated with a reduced T-cell infiltration and phospholipase A2 (PLA2) activity and also increased astrocytes and microglial activation (Do Carmo et al., 2008). Cytokines and chemokines were also modulated in transgenic mice (Tg) during infection compared to WT. Therefore, we speculated that APOD may be beneficial through regulation of several aspects of inflammation including COX-2, PPAR γ and NF κ B pathways.

Using the OC43 mouse model of neurodegenerative disease, we identified several nuclear factors from the cortex of control or OC43-infected mice which bind a fragment of the human *APOD* promoter in the region -816/+64. We demonstrate that, among these nuclear factors, the non-structural OC43 Ns2 protein binds the *APOD* promoter and regulate its expression.

5.5 MATERIALS AND METHODS

5.5.1 Cell culture and reagents

Mouse fibroblast cells (NIH/3T3) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin G (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml). NIH/3T3 cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and were fed every 2 days with fresh medium.

5.5.2 Virus and mice infection

The HCoV-OC43 strain (rOC/ATCC number VR-759) was grown on the HRT-18 cell line and virus stocks ($10^{6.5}$ TCID₅₀/ml) were kept at -80°C as previously described (Jacomy and Talbot, 2003). The mutated OC43 virus (rOC/ns2stopdel) was obtained by mutating the fifth codon into a stop codon and deleting the region containing amino acid 90 to 203 from the wild-type HCoV-OC43 strain. It was produced as the WT virus. Mice were infected at 28 days postnatal (DPN) with intracerebral (IC) inoculation of 10 µl containing 10 TCID₅₀ of WT or mutated virus. Control mice received an intracerebral inoculation of 10 µl of cell culture medium. Mice (C57/BL6) were killed at 7 days postinfection (DPI), and brain tissues were collected and kept at -80 °C until use.

5.5.3 Extraction of total proteins

For total protein extraction, brain tissues were homogenized in 100 µl lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, and 200 µM Sodium orthovanadate (Na₃VO₄) and 10% CompleteTM protease inhibitors (Roche, Indianapolis, IN)). After 30 min incubation at 4°C, lysates were cleared by 10 min of centrifugation at 20,000xg at 4°C. The protein concentration was determined at 595 nm using the Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

5.5.4 Western blot

Protein extracts (50µg) were heated for 5 min at 95°C and loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. The gel was subjected to electrophoresis for 1 h at 100 V and then

transferred by electroblotting to a polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore, Bedford, MA) membrane for 45 min at 300 mA. Membranes were blocked for 1 h at room temperature with blocking buffer (PBS containing 0.2% Tween 20 and 5% skim milk powder) and incubated overnight at 4 °C with anti-mouse GAPDH (1:10 000; Calbiochem, Darmstadt, Germany), anti-goat ApoD (1:1000; Santa Cruz, CA) anti-mouse Nf- κ B-p50 (1:1000; Santa Cruz), anti-mouse Ppar- γ (1:1000; Santa Cruz), anti-rat Ido (1:500; Biolegend, San Diego, CA), anti-rabbit Stat-3 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danver, MA), anti-rabbit phospho-Stat-3 (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-rabbit phospho-Ampk (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-rabbit Erk1/2 (1:1000; Cell Signaling Technology) or anti-rabbit phospho-Erk1/2 (1:1000; Cell Signaling Technology) antibodies in the blocking buffer. Subsequently, the blots were incubated at room temperature with a secondary horseradish peroxidase conjugated anti-host antibodies in the blocking buffer. The blots were developed using the enhanced chemiluminescence method with autoradiography films (Denville Scientific Inc., Metuchen, NJ).

5.5.5 Luciferase assays

The cDNA of Non-structural protein 2 (Ns2) was cloned in pIRES-EGFP (pIRES-Ns2-EGFP) expression vector. The empty vector (pIRES-EGFP) was used as control. The plasmids were transiently co-transfected in NIH/3T3 cells in the presence of Polyfect (Qiagen) as recommended by the manufacturer, with a vector containing the *APOD* promoter upstream of the luciferase reporter gene (−558/+64- and −1760/+64-*apoD*-Luc). Forty-eight hours post-transfection, transfected cells were lysed and luciferase activity was measured with the Dynex MLX microplate luminometer (MLX Dynex Technologies, Chantilly, VA) as already described (Do Carmo et al., 2008). Each sample was co-transfected with the β -gal-expressing vector for normalization (pcDNA-lacZ). The β -galactosidase activity was measured using the Galacto-Light™ kit (Applied Biosystems, Bedford, MS) according to manufacturer's suggestions. Luciferase activity is presented in Relative Light Units (RLU) and represents the calculated mean \pm SD of three transfected samples normalized by the measured β -galactosidase activity.

5.5.6 Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from the cortex, hippocampus and cerebellum of control or infected mice using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario). RNA was reverse-transcribed using Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The reverse transcriptase products (50 ng) were used for amplification with specific primer for *Cox-2* (COX-2_forward: 5'-ATGCTCTTCCGAGCTGTGCTGCTCT-3'; COX-2_reverse: 5'-TCGGGTGAACCCAGGT-CCTCGCTT-3'), *Stat-1* (STAT-1_forward: 5'-ATGTCACAGTGGTTCGAGCTTCAGC-3'; STAT-1_reverse: 5'-GAATATTTCCCTCCTGGGCCTGATTAAATCT-3'), *Stat-3* (STAT-3_forward: 5'-ATGGCTCAGTGGGAACCAGCTGCA-3'; STAT-3_reverse: 5'-TTCT-CAAGATACCTGCTCTGCAGAACTG-3') or *Gapdh* (GAPDH_forward: 5'-GGTGAAG-GTCGGTGTGAACGG-3'; GAPDH_reverse: 5'-ATGGGGGCATCGGCAGAAGG-3) genes.

5.5.7 Statistical analysis

Statistical significance of the experiments was evaluated using an unpaired Student's *t*-test. Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

5.6 RESULTS

5.6.1 Ns2 binds and regulates the *APOD* promoter

We previously showed using mass spectrometry (chapter III) that Ns2 protein can bind the *APOD* promoter in the cortex of OC43-infected mice. Six overlapping regions of the *APOD* promoter, representing nucleotide -816 to +64, were used in order to bind and identify nuclear factors. From these regions, Ns2 was purified from regions 1, 3 and 4 (Table 5.1; for material and methods see chapter IV) which contain several responsive elements. Among these elements, the ERE (Estrogen Responsive Element) and APRE (Acute Phase Responsive Element) are common to all three regions. To determine if Ns2 could regulate the *APOD* promoter, the cDNA of Ns2 gene (pIRES-Ns2-EGFP) or the control (pIRES-EGFP) were co-transfected with constructs containing the *APOD* promoter upstream of the luciferase reporter gene (-558/+64- and -1750/+64-apoD-pGL3) and with pcDNA-LacZ. The luciferase activity was analyzed in NIH/3T3 cells 48h post-transfection. The Ns2 overexpression significantly activated the *APOD* promoter compared to control for both the *APOD* promoter constructs (Figure 5.1).

We further verified if Ns2 could regulate the ApoD expression *in vivo*. C57BL/6 mice were infected with wild-type strain OC43-WT or the mutated virus lacking the Ns2 gene (OC43delNs2) and ApoD expression was analyzed by western blot in the cortex, hippocampus, medulla and spinal cord. In all regions of the brain tested, the induction of ApoD expression was strongly reduced in OC43delNs2-infected mice compared to the wild type virus strain (Figure 5.2). The sample loading in each wells was verified qualitatively by red ponceau staining (data not shown). These results indicate that Ns2 could positively regulate the ApoD expression both *in vitro* and *in vivo*.

5.6.2 Modulation of neuroinflammatory factors in transgenic mice for the human *APOD* gene

We previously showed that mice transgenic for the human *APOD* gene had a greater survival rate during OC43 infection compared to their wild-type littermates and was correlated with increased astrocytes and microglial activation and several other components

implicated in inflammation (Do Carmo et al., 2008). Therefore, we speculated that APOD could regulate several aspects of the inflammatory pathway. To further investigate the role played by APOD in this context, we analyzed key factors implicated in neuroinflammatory pathways and neurodegenerative diseases. Among these factors, Nf- κ b, Ppar- γ , indoleamine-2,3-dioxygenase (Ido), pErk1/2, pAmpk and pStat-3 were analyzed by western blot. Of note, Erk1/2 were also identified as binding factors located on the *APOD* promoter in the cortex of infected-mice (see chapter III, section 3.2.9). In Figure 5.3, we observed that pErk1/2 and pStat-3 are activated during infection in both WT and Tg mice compared to uninfected mice. In the case of Ampk and Erk1/2, their phosphorylation state was more prominent in infected Tg mice and their protein expression were not modulated during infection (data not shown). Interestingly, Nf- κ b (p50), Ppar- γ and Ido were found repressed in infected WT mice but drastically induced in infected Tg mice.

We also analyzed the expression of *Cox-2*, *Stat-1* and *-3* by RT-PCR. The mRNA expression of both *Cox-2* and *Stat-1* is significantly induced during infection in the cortex, hippocampus and cerebellum in OC43-WT-infected mice compared to control. The expression of *Stat-3* was found induced to a lower extent and only in the cerebellum (Figure 5.4).

5.7 DISCUSSION

The human coronavirus OC43 (HCoVOC43) has neurotropic properties and has been implicated in neurological disorders such as multiple sclerosis. It also serves as a mouse model for acute encephalitis following intracerebral inoculation (Jacomy et al., 2003; Do Carmo et al., 2008). Recently, we demonstrated that *ApoD/ApoD* gene and protein expression are upregulated during OC43-infection in strong correlation with the virus presence and replication (Do Carmo et al., 2008). We provided evidence that transgenic mice overexpressing the human *APOD* gene in neurons are more resistant to neurodegenerative challenges (Do Carmo et al., 2008, Gandforina et al., 2008). We also showed by mass spectrometry that the Ns2 protein of OC43 virus binds the *APOD* promoter in multiple sites. Our unpublished observations show that Ns2 is not implicated in viral replication. Effectively, no difference in viral kinetic replication was observed in neuron differentiated LA-N-5 cells infected by OC43-WT and OC43delNs2 viruses. In this study, we present a novel function for Ns2 through binding and transactivating the *APOD/ApoD* gene and protein expression in NIH/3T3 cells as well as in several regions of the mouse brain, respectively. By upregulating the *ApoD* gene expression during infection, the virus may use Ns2 protein in order to keep the symbiosis relation with the host at a steady state. Effectively, this mechanism may confer an advantage for the virus by allowing persistence in the host via upregulation of neuroprotective genes such as ApoD. Further investigations are required to verify if the OC43 virus mutated for its Ns2 gene is more neurovirulent than the wild type virus.

We also showed the implication of APOD overexpression in inflammatory pathway during OC43 infection by analyzing the expression of several inflammatory factors. We showed that Nf- κ b (p50), Ppar- γ and Ido proteins were strongly induced in the cortex of infected transgenic mice compared to wild type mice infected or not (Figure 5.3). These results are in agreement with data from the literature. Effectively, clinical trial studies of Alzheimer patients have demonstrated the beneficial role of agonist synthetic ligands such as pioglitazone (Do Carmo et al., 2008) and rosiglitazone (Geldmacher et al., 2011; Sato et al.,

2011) which activate PPAR γ . The therapeutic potential through Ppar- γ activation is well established in several mouse models of Alzheimer's disease (Watson et al., 2005).

It is also known that PPAR γ anti-inflammatory action is exerted through direct inhibition of NF- κ B transcriptional activity (Mandrekar-Colucci and Landreth, 2011). Therefore, NF- κ B inhibition is also a therapeutic target in neurodegenerative disease which blocks the expression of pro-inflammatory molecules such as TNF- α , IL-6, COX-2 and several others. However, NF- κ B can also activate PPAR γ through a feedback loop (Pascual et al., 2005). Our results show that both Ppar- γ and Nf- κ b are repressed in OC43-infected mice but upregulated in infected transgenic mice reflecting the complexity of their respective pathways. It is possible that other mechanisms of regulation of these proteins and their respective roles confers protection in *APOD* transgenic mice.

The neuroprotective role of APOD may involve regulation of Ido as a key immunomodulator implicated in several autoimmune diseases such as multiple sclerosis (Farooqui et al., 2007). Indeed, this protein has a profound effect in the maintenance of the foetus during pregnancy by inhibiting the immunity against paternal inherited antigens. This mechanism of action of IDO is also reflected in women with multiple sclerosis who remains asymptomatic during pregnancy.

We also showed that phosphorylation of Erk1/2 and Ampk is activated during infection and even more in infected transgenic mice compared to wild-type (Figure 5.3). ERK1/2 and AMPK are central proteins with pleiotropic functions implicated in several biological pathways. In respect to the PPAR γ pathway, ERK1/2 and AMPK were shown to activate this protein (Penberthy and Tsunoda, 2009). ERK1/2 are also regulated by several intermediate molecules in the synthesis of cholesterol. Also, AMPK can inhibit HMG-CoA Reductase (HMGR) and upstream enzyme in the cholesterol pathway implicated in development of Alzheimer's disease (Burns and Vanden Heuvel, 2007). The use of AMPK activator such AICAR was shown to attenuate neurodegeneration in EAE (Motoshima et al., 2006; Poirier, 2005). The use of statins, an inhibitor of HMGR which lowers cholesterol levels, is also

employed for its benefic roles in patients with Alzheimer's diseases (Paintlia et al., 2006; Prasad et al., 2006).

All members of the MAPK family including JNK/SAPK, p38 and ERK5, as well as ERK1/2 are suggested to be both prosurvival and also to promote neuronal cell death. (Willey and Elkind, 2010). These discrepancies may reflect the complex regulation of these proteins in several cellular pathways. We previously demonstrated that APOD could interact with ERK1/2 and inhibit its nuclear translocation in vascular smooth muscle cells (Miloso et al., 2008; Subramaniam and Unsicker, 2006; Subramaniam and Unsicker, 2010). APOD overexpression in neurons may have a different effect shown by the induced phosphorylation of Erk1/2 during OC43 infection. Analyzing the localization status of Erk1/2 in these different mice models will help our understanding of MAPK function in the neuronal fate and decipher the implication of APOD and MAPK interaction.

Overall, these results propose a function for Ns2 as a regulatory protein able to bind the APOD promoter and modulate its gene expression *in vivo*. It would be important to understand how it binds the promoter, regulates *ApoD* gene expression and identify the responsive elements involved in this regulation. A particular attention should be given to ERE and APRE since these elements are common to all DNA regions bound by Ns2. Since Ns2 does not contain an NLS or a DNA-binding domain, it would also be interesting to determine how it reaches the nucleus and identify its proteins partners. We speculate that APOD neuroprotective role may also be through regulation of key inflammatory factors implicated in neurodegenerative diseases and of particular interest, PPAR γ and NF- κ B. Therefore, proteins or synthetic molecules that can activate the *APOD* gene expression may have a potential therapeutic effect in several neuropathological situations.

5.8 ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge support from the Canadian Institutes for Health Research to ER (Grant MOP-15677).

Table 5.1. Identification of Ns2 protein of the OC43 virus by mass spectrometry analysis. Nuclear extracts from the cortex of control or OC43-infected mice were incubated with six overlapping regions (1-6) of the *APOD* promoter (approx. 200pb for each regions) bound to streptavidin beads. The bound proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE and coomassie blue staining. Each well was cut in 14 distinct bands, eluted and analyzed by mass-spectrometry analysis (LC-MSMS velos) after tryptic digestion. MW, Molecular Weight.

Protein ID	Acc. No	region 1		region 2		region 3		region 4		region 5		region 6	
		ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43	ctrl	OC43
Ns2	Q80872	0	2	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0

5.9 FIGURE LEGENDS

Figure 5.1. Ns2 transactivates the *APOD* promoter. NIH/3T3 cells were co-transfected with vectors containing luciferase reporter constructs under the 5'-flanking region of *APOD* promoter (-558/+64- and -1750/+64-apoD-pGL3), the cDNA corresponding to the Ns2 cDNA (pIRES-Ns2-EGFP) or the control (pIRES-EGFP; empty vector) and plasmid pcDNA-LacZ. After transfection, cells were cultured with media (10% serum) for 48h. (All experiments were done in triplicate, *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001).

Figure 5.2. Western blot analysis of ApoD expression in the cortex of OC43-WT or OC43delNs2-infected mice. C57B/L6 mice were inoculated intracerebral (IC) with the virus mutated for the NS2 gene (OC43delNs2; a, b and c) or the wild-type virus (OC43-WT; d, e and f) or cell culture medium (control; c1 and c2). Total proteins were extracted and expression of ApoD gene was analyzed by western blot.

Figure 5.3. Western blot analysis of inflammatory factors in the cortex of OC43-WT-infected mice. C57B/L6 mice (WT) and mice transgenic for the human *APOD* gene (Tg) were inoculated IC with the wild-type OC43 virus (OC43-WT) or cell culture medium (control). Total proteins were extracted and expression of the different genes analyzed by western blot. Representative of at least three similar experiments.

Figure 5.4. Analysis of *Cox-2*, *Stat-1* and *-3* expression in the cortex, hippocampus and cerebellum of OC43-WT-infected mice. C57B/L6 mice were inoculated IC with the wild-type virus (OC43-WT) or cell culture medium (control). Total RNA was extracted and expression of *Cox-2*, *Stat-1* and *-3* genes was analyzed by RT-PCR. The *Gapdh* gene was used as internal control. All experiments were done in triplicate, *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001).

Figure 5.1

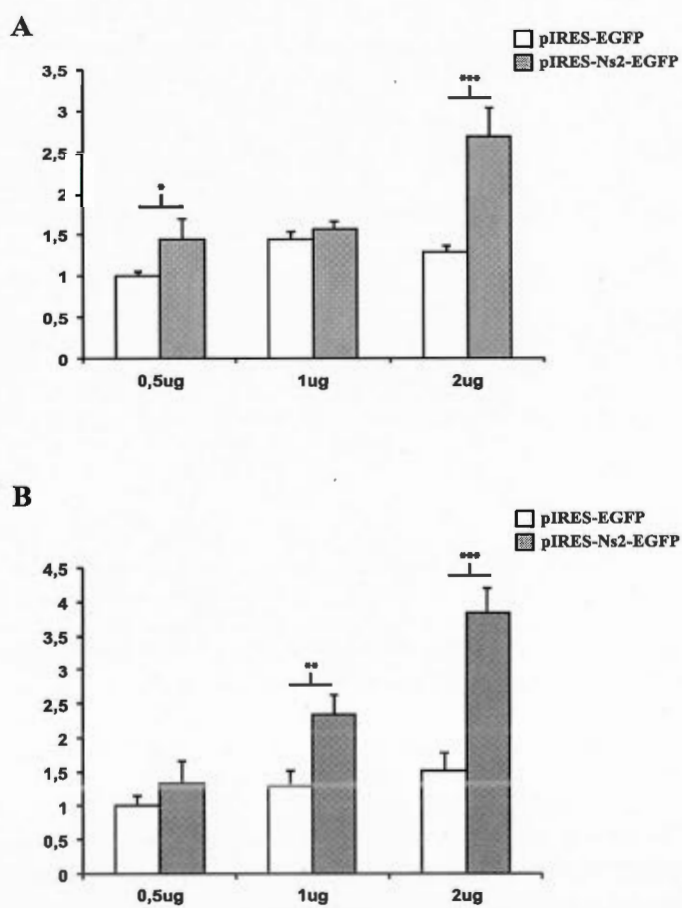


Figure 5.2

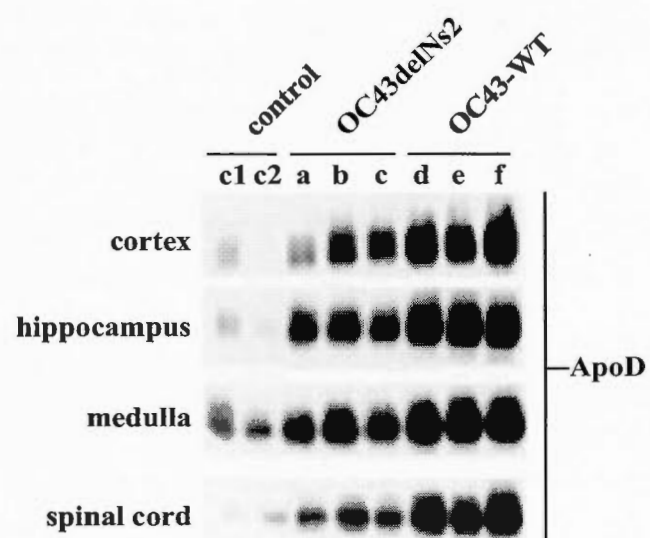


Figure 5.3

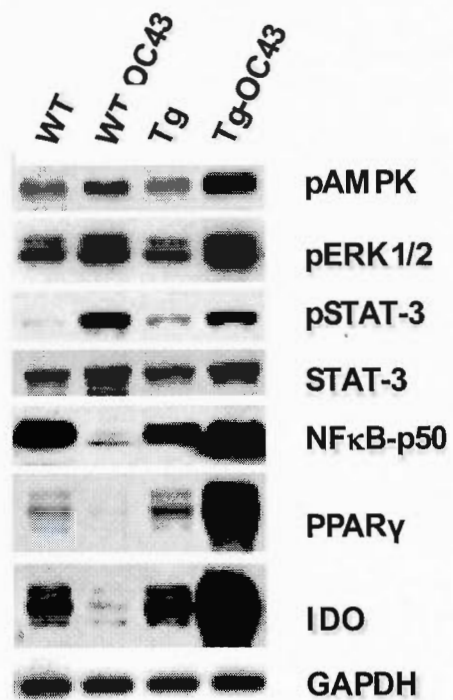
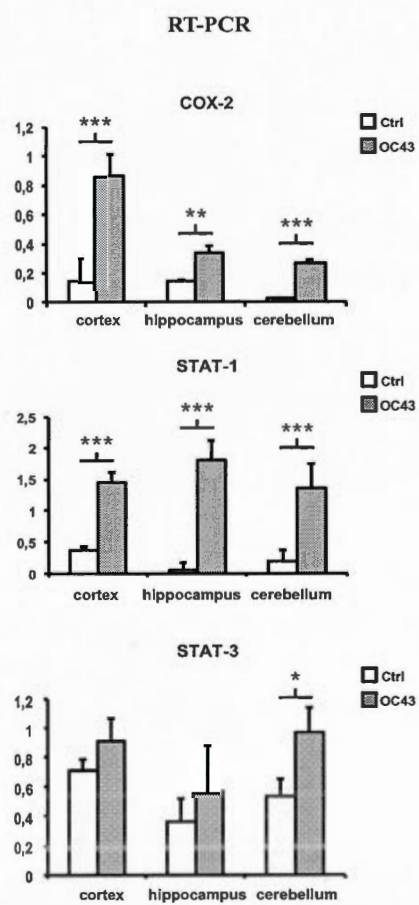


Figure 5.4



CHAPITRE VI

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6.1 CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de démontrer l'implication de plusieurs facteurs nucléaires dans la régulation de l'expression génique d'*APOD* en liant son promoteur lors de stress cellulaires. La caractérisation de quelques-unes d'entre elles a permis d'éclaircir certains mécanismes impliqués. Sachant que l'expression d'*APOD* est fortement induite lors de désordres neurologiques et que sa présence semble être bénéfique, ce projet apporte des outils afin d'étudier plus en profondeur les mécanismes de régulation de ce gène pouvant aboutir à des cibles thérapeutiques.

Dans un premier temps, nous avons identifié les facteurs nucléaires Parp-1, HnRNP-U, CBF-A, BUB-3, Kif4, APEX-1 et Ifi204 capables de lier le promoteur d'*APOD* soit en condition normale soit en arrêt de croissance induit par déprivation de sérum. De plus, nous montrons que Parp-1, APEX-1 et Ifi204 sont aussi régulés à la hausse lors de l'arrêt de croissance alors que l'effet contraire est observé pour Kif4. En liant le promoteur d'*APOD* uniquement en condition normale, Kif4 pourrait être impliqué dans la répression génique d'*APOD* en condition physiologique. Par ailleurs, nous montrons que les protéines Parp-1, HnRNP-U, Ifi204 et APEX-1 transactivent le promoteur d'*APOD*. L'utilisation de ces protéines porteuses de mutations ponctuelles ou encore de délétions, de même que l'emploi d'inhibiteurs spécifiques bloquant leur expression ou leur activité catalytique, y compris celle des protéines ERK1/2, confirment leur implication dans l'activité transcriptionnelle de l'*apoD* lors de l'arrêt de croissance.

Par la suite, nous avons effectué la même étude dans un modèle murin de neurodégénérescence. Cette étude, de plus grandes envergures, a permis d'identifier plusieurs

centaines de protéines liant le promoteur d'*APOD* dans la région -816 à +64 provenant de cortex de souris saines ou infectées intracorticalement par un coronavirus humain OC43 et où l'expression génique d'*ApoD* est fortement induite. La liste des protéines a été répertoriée dans un tableau présenté dans le chapitre III (Table 3.1) et servira plus tard à créer une banque de données. Plusieurs faits intéressants ressortent de cette analyse. Tout d'abord, nous montrons que plusieurs protéines ont des fonctions diverses reflétant la complexité de régulation du gène d'*APOD*. Plusieurs d'entre elles font partie de la même famille telle que les HDAC, ARN hélicases, les protéines chaperonnes et les HnRNPs. Par contre, d'autres protéines identifiées n'ont jamais été reportées dans la littérature pour jouer un rôle en tant que facteur de transcription. Effectivement, parmi ces protéines, on retrouve l'ApoE et la protéine non-structurale Ns2 du coronavirus. Leur caractérisation fait l'objet de cette étude présentée dans cette thèse.

Comme mentionné, la présence d'ApoE sur le promoteur d'*APOD* ainsi que sa caractérisation apporte une certaine clarification dans la régulation du gène d'*APOD* pouvant être mis en relation avec les processus impliqués dans les maladies neurodégénératives, telles que l'Alzheimer. Premièrement, nous montrons par la technique de ChIP que les isoformes E3 et E4 lient effectivement le promoteur d'*APOD* *in vivo* dans divers types de cellules et agissent en tant que répresseurs en condition normale de même qu'en situation de stress dans les cellules de glioblastomes humains (U87). Cet effet négatif sur la transcription du gène d'*APOD* est confirmé en utilisant des ARN interférents dirigés contre l'isoforme E3 où l'on observe l'effet inverse, c'est-à-dire une transactivation plus importante du promoteur d'*APOD* tant en condition normale qu'en situation de stress causé par la déprivation de sérum ou encore en présence de LPS, une molécule inflammatoire. En contraste, l'isoforme E2, le seul isoforme reconnu comme neuroprotecteur, n'a aucun effet sur la transactivation du promoteur et cela a été imputé au fait que l'APOE2 est incapable de lier le promoteur d'*APOD*. Deuxièmement, nous avons montré une corrélation inverse entre l'expression génique d'*ApoD* et d'*ApoE* en nous basant sur des bases de données d'hybridation *in situ* (Allen Brain Atlas) et le transcriptome du nouvel Atlas of the mouse Neocortical layers. Ces résultats importants sont les premiers à démontrer une nouvelle fonction pour l'APOE en tant

que régulateur de l'expression génique d'*APOD* de par sa liaison au promoteur.

Dans un autre volet, nous avons caractérisé la protéine non-structurale Ns2 et clairement montré son implication dans la transactivation du promoteur d'*APOD* *in vitro* dans des cellules fibroblastes murins et *in vivo* dans plusieurs régions de cerveaux de souris infectées par un virus muté pour le gène Ns2. De plus, nous montrons que la surexpression d'*APOD* humaine chez les souris transgéniques semble réguler plusieurs facteurs impliqués dans l'inflammation et fort probablement dans les maladies neurodégénératives. En effet, nous montrons que 1) les protéines Nf- κ b (p50), Ppar γ et l'indoleamine-2,3-dioxygénase (Ido) sont réprimées dans le cortex de souris infectées par rapport aux souris contrôles et fortement induites chez les souris transgéniques, 2) les protéines Erk1/2 et Stat-3 sont hyperphosphorylées chez les souris infectées que ce soit chez les transgéniques ou chez les souris de type sauvages, alors que l'Ampk est phosphorylée uniquement chez les souris transgéniques infectées, 3) l'expression des gènes *Stat-1* et *Cox-2* est augmentée dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet de souris de type sauvage alors que l'expression de *Stat-3* n'est modulée que dans le cervelet. Ces résultats suggèrent aussi une nouvelle fonction pour la protéine Ns2 du coronavirus humain OC43 dont le rôle demeurerait jusqu'à présent inconnu.

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans cette thèse apportent une lumière sur les acteurs clés dans la régulation du gène d'*APOD* lors de stress cellulaires. Une caractérisation plus poussée de ces protéines identifiées permettrait d'avancer dans la recherche sur la fonction et les mécanismes de régulation de ce gène. Il est évident que la caractérisation de ces nombreuses protéines requerra plusieurs années de travail dans l'espoir d'aboutir à des découvertes intéressantes, de longues portées et ayant un impact sur la santé humaine.

6.2 PERSPECTIVES

Une étude plus poussée serait nécessaire afin de caractériser les protéines spécifiques liant le promoteur d'*APOD*, notamment celles repêchées dans le cortex de souris saines ou infectées par le coronavirus OC43. Une attention particulière serait accordée aux protéines liant deux fragments chevauchants permettant un ciblage des éléments régulateurs retrouvés dans la région commune. À partir de ce ciblage, ces éléments pourraient être analysés par la technique de retard sur gel et de ChIP. Des mutations ponctuelles seront réalisées sur ces éléments cis retrouvés sur le promoteur pour ensuite être clonés dans des vecteurs en amont d'un gène rapporteur tel que la luciférase afin de confirmer leur importance dans la régulation du gène d'*APOD*. Dans un même ordre d'idée, des mutations effectuées sur les facteurs nucléaires trans permettraient de caractériser les différents domaines de ces protéines impliqués dans la régulation d'*APOD*. Lors de cette étude, on déterminerait les domaines d'activation de la transcription, de liaison à l'ADN ou d'interactions protéines-protéines ce qui permettrait de classer ces protéines en tant qu'activateurs, répresseurs ou cofacteurs.

Bien que nous ayons clairement démontré *in vivo* la liaison des isoformes APOE3 et E4 au promoteur d'*APOD* par la technique de ChIP, il serait primordial d'étudier le rôle de ces protéines, y compris l'isoforme E2, sur la régulation transcriptionnelle d'autres gènes. En effet, nous montrons que l'APOE2 ne lie pas le promoteur d'*APOD*. Par contre, il est fort possible que ces protéines puissent lier le promoteur de plusieurs autres gènes. La technique de ChIP-seq à l'aide d'anticorps spécifiques à chaque isoformes permettrait d'immunoprécipiter la chromatine. Par la suite, les fragments d'ADN immunoprécipités seraient purifiés et séquencés afin de localiser les régions liées par les isoformes APOE sur l'ensemble du génome. Comme mentionné dans le chapitre IV (section 4.6), il serait intéressant de vérifier l'expression génique d'*ApoD* notamment dans le cortex de souris « *Knock-in* » pour les isoformes APOE2, -E3 et -E4. Nous nous attendons à ce que l'expression d'*ApoD* soit réprimée chez les transgéniques E3 et E4. Quant aux souris transgéniques APOE2, il est tentant de spéculer qu'elles auraient un effet semblable aux souris « *knock-out* » et où l'expression d'*ApoD* serait induite comparativement aux souris de

type sauvages (Terrisse et al., 1998). L'expression d'*ApoD* serait aussi analysée chez ces souris « *Knock-in* » suite à une infection au coronavirus OC43 afin de déterminer si le rôle neuroprotecteur d'APOE2 serait dû uniquement par une non-répression d'ApoD. Par la suite, cette étude pourrait être réalisée chez l'humain, à partir de cerveaux provenant de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer et de génotype différents. De plus, un seul et deux acides aminés diffèrent respectivement entre les isoformes E2 et E3 et entre E2 et E4. Un changement d'un tel acide aminé, plus précisément une cystéine pour une arginine, pourrait être impliqué dans les processus amenant d'une part à leur localisation dans le noyau et leur interaction avec l'ADN. L'absence de la liaison d'APOE2 à l'ADN due à un seul acide aminé semble peu probable. Toutefois, il serait tentant, encore une fois, de spéculer que ce changement d'acide aminé conférant un changement au niveau de la structure tertiaire de la protéine, l'empêcherait de lier l'ADN ou d'interagir avec d'autres protéines ou encore d'être localisée au noyau. De plus, ce changement d'acide aminé confère une charge isoélectrique différente entre les isoformes APOE. Par ailleurs, l'isoforme APOE4 est beaucoup plus instable que l'isoforme E3, qui elle-même serait plus instable que l'isoforme E2. Cette instabilité, causée par un clivage protéolytique, amène à la production de petits fragments peptidiques, considérés toxiques pour les neurones, pourraient expliquer la localisation nucléaire de même que la liaison des isoformes E3 et E4 au promoteur d'*APOD*.

Il serait aussi intéressant d'étudier les protéines liant le promoteur d'*APOD* uniquement dans des conditions de neurodégénérescence, par exemple les facteurs de transcription Ccrl1 et Gelsoline (Gsn). On constate aussi que plusieurs facteurs nucléaires identifiés sont impliqués dans le cycle cellulaire ou les cancers et aussi dans les maladies neurodégénératives en accord avec les rôles proposés et la régulation de l'expression génique d'*APOD* dans ces pathologies. Sachant l'étroite relation qui existe dans les mécanismes amenant au développement de cancer et les maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer (Moh et al., 2011) ainsi que la régulation de l'expression génique d'*APOD* dans ces pathologies, il serait intéressant d'identifier les facteurs impliqués dans l'un ou l'autre de ces mécanismes afin de repérer des dénominateurs communs. L'une des protéines décrites

dans le chapitre III, Pin1, pourrait jouer un tel rôle de même que les autres membres de cette famille (section 2) dont leurs fonctions dans le noyau restent à déterminer.

Les protéines liant le promoteur d'*APOD* uniquement en condition contrôle sont toutes aussi intéressantes et auraient probablement un rôle en tant que répresseurs, notamment en condition physiologique. De la même manière, d'autres protéines pourraient être constitutivement liées au promoteur d'*APOD*. Bien qu'au départ elles apparaissent comme des protéines non-spécifiques, elles pourraient être activées en condition de neurodégénérescence et jouer un rôle dans le recrutement de facteurs de transcription de type activateur ou encore dans les modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et la déubiquitinylation décrites précédemment pour les enzymes « *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* » (voir chapitre 3, section 3.2.11).

Plusieurs des protéines identifiées sont déjà caractérisées dans la littérature. L'utilisation de souris transgéniques ou « *Knock-out* » pour les gènes de ces protéines permettrait d'appuyer ces résultats *in vivo*. En effet, l'analyse de l'expression génique et protéique d'*ApoD*/ApoD par des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie dans le cerveau de ces souris génétiquement modifiées démontrerait aussi d'une autre manière leur rôle en tant que facteur de transcription important dans le SNC.

Dans le cortex, il existe plusieurs types de cellules telles que les neurones ou les cellules gliales. Il est fort probable que l'expression d'*ApoD* soit régulée par différents facteurs de transcription spécifiques à chacune de ces lignées cellulaires expliquant un si grand nombre de protéines identifiées. Il serait intéressant d'effectuer la même étude de purification et d'analyse par spectrométrie de masse à partir de lignée primaire ou transformée et mise en culture en condition normale ou en présence de stress. Ces lignées cellulaires seraient d'origine neuronale ou gliale, comprenant les astrocytes et les oligodendrocytes, les trois principaux types de cellules retrouvées dans le cerveau. À long terme, il serait important aussi d'identifier les facteurs nucléaires à partir de tissus différents tels que l'hippocampe et

dont l'induction de l'expression génique d'*ApoD* est encore plus grande lors de l'infection (Do Carmo et al., 2008).

Finalement, l'APOD pourrait être considérée comme une protéine curative ayant des propriétés antioxydante et neuroprotective. Ainsi, en utilisant une plateforme permettant le criblage de plusieurs molécules naturelles ou synthétiques capable d'activer le promoteur d'*APOD*, il serait possible d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques pour les personnes atteintes de désordres neurologiques ou d'autres situations pathologiques. Cette plateforme serait constituée de plaque multipuits dans lesquelles des cellules seraient mises en culture et transfectées avec des vecteurs contenant le promoteur d'*APOD* couplé à un gène rapporteur. L'ajout de différentes molécules dans chaque puits transactivant fortement le promoteur aura un intérêt majeur en vue d'une thérapie. Il est fort probable que ces molécules agiront à différents niveaux à l'intérieur de la cellule. Effectivement, il est possible que ces molécules lient des récepteurs cellulaires activant des cascades de signalisation pour aboutir à la transactivation du gène d'*APOD*. Ces molécules pourraient aussi agir directement en liant des récepteurs nucléaires. Les différentes possibilités sont grandes. D'ici là, la patience est de mise, car il faudra attendre plusieurs années entre la découverte d'une telle molécule, son mode d'action biologique, son innocuité clinique et son adéquation en vue d'un nouveau traitement potentiel pour les personnes malades.

ANNEXE A

AUTRE CONTRIBUTION – COLLABORATION AVEC LE Dr. RICHARD
DESROSIERS (UQAM)

DOPAMINE INHIBITS PROEIN L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE AT
BOTH PROTEIN AND GENE LEVELS IN SH-SY5Y CELLS

Dahmane Ouazia, Louis-Charles Levros, Éric Rassart et Richard Desrosiers

Expériences en cours

2012

La protéine PIMT est une enzyme réparatrice qui diminue l'accumulation de protéines altérées post-traductionnellement suite à la formation anormale de résidus L-isoaspartyls (Sarjeant et al., 2003). Dans la littérature, on rapporte qu'elle joue un rôle important dans le cerveau ainsi que dans plusieurs pathologies impliquant le stress oxydatif. Ces altérations apparaissent lors du vieillissement ainsi que dans plusieurs pathologies telles que la maladie d'Alzheimer (Lanthier and Desrosiers, 2004). En relation avec ces faits, l'expression de la PIMT semble diminuer avec l'âge ce qui pourrait expliquer l'accumulation de protéines altérées. De plus, l'expression de PIMT est augmentée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et serait localisée au niveau des enchevêtrements neurofibrillaires (Shimizu et al., 2000).

Le but de cette collaboration avec l'équipe du Dr Desrosiers du Département de Chimie à l'Université du Québec à Montréal (UQAM) a été d'étudier les mécanismes de régulation du gène *PIMT* au niveau du promoteur ainsi que sa fonction au niveau du gène. Pour ce faire, les éléments de réponses dans la région -2073 à +230 du promoteur de *PIMT* ont été identifiés par analyse bio-informatique en utilisant le logiciel TFSEARCH (Figure A.1). Par la suite, nous avons créé des mutants délétionnels du promoteur par la technique de PCR (Figure A.2). Nous nous sommes intéressés aux éléments de réponses reconnus par les facteurs de transcription (et portant le même nom): SREBP, NF- κ B, CREB et NRF2. Ces éléments sont connus pour être impliqués dans les maladies neurodégénératives ainsi qu'en situation de stress oxydatifs et inflammatoires. Une attention particulière fut accordée aux éléments de réponses NRF2, retrouvés à cinq endroits sur le promoteur. Effectivement, NRF2 (aussi connu sous le nom de «Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2)» ou «NF-E2-related factor 2 (NRF2)») est considéré comme le facteur de transcription majeur pour l'élément de réponse ARE («Antioxidant Response Element») et active plusieurs gènes tels que glutathione S-transférase (GST), catalase (CAT) thioredoxin réductase (TR), peroxirédoxins (Prxs) et superoxide dismutase (SOD) (Shimizu et al., 2000). Bien que cet élément de réponse soit connu dans la littérature sous le nom ARE, le logiciel TFSEARCH l'identifiait avec l'annotation NRF2. Effectivement, la séquence consensus du ARE est 5'-TMAⁿⁿRTGAYⁿⁿⁿGCR^{www}-3' dont le coeur de la séquence est indiqué en caractère gras (Li et al., 2007; van Muiswinkel and Kuiperij, 2005) et a une forte homologie de

séquence avec le NRF2 ayant eu le plus haut score et d'orientation négative (-) sur le promoteur de *PIMT* (Figure A.1 et A.2B).

Ainsi, à partir du promoteur complet (WT), les mutants P6, P4, P3 et P1 correspondent à des délétions progressives pour les 5 éléments de réponses NRF2 (Figure A.2A). La position exacte de ces éléments NRF2 ainsi que le score ayant permis leur identification sur le promoteur est répertoriée dans la Figure A.2B. Tous les mutants (P1 à P8) ainsi que le WT ont été clonés dans le vecteur pGL4. Au cours de cette étude, des tests de luciférase permettront de mesurer l'activité du promoteur dans les neuroblastomes humains SH-SY5Y dans différentes conditions de stress.

Finalement, la protéine PIMT contient 3 cystéines (cys43, cys95 et cys102) possiblement impliquées dans l'interaction avec d'autres protéines et qui jouent un rôle important dans la localisation intracellulaire et l'activité enzymatique de la protéine. Ainsi, pour mieux élucider la fonction de cette protéine, nous avons remplacé par mutagenèse dirigée chacune de ces cystéines par des alanines. Nous avons aussi créé toutes les possibilités de mutations en effectuant les combinaisons de double (deux cystéines mutées) et triple (3 cystéines mutées) mutants en fusion avec ou sans l'épitope myc (Figure A1.4). Ces mutants ont été clonés dans le vecteur d'expression pCMV6. Des tests de transfection stable de ces mutants permettront d'effectuer une étude fonctionnelle de cette protéine.

L'idée et l'élaboration de cette étude expérimentale proviennent du Dr Richard Desrosiers. J'ai réalisé la construction des mutants du promoteur et du gène *PIMT*, comprenant aussi la conception des amorces et l'analyse par bio-informatique du promoteur.

Table A.1. Séquences des amorces ayant permis l'amplification par PCR des mutants délétionnels du promoteur *PIMT*. La température de fusion (T_m) a été calculée en utilisant le logiciel « oligo calculator ». Les amorces sens ont été nommées P1 à P8 et l'amorce anti-sens, Pa. Pour chacune des amorces, des mutations ponctuelles ont été insérées (en minuscule et caractère gras) afin de créer des sites de restrictions pour les enzymes KpnI et XhoI nécessaires pour l'orientation des inserts lors de la ligation avec le vecteur pGL4 digérés par ces mêmes enzymes.

<i>Mutants</i>	<i>Séquences</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Enzymes</i>
P8	5' -GTGGAG GTac CAATGAGCCAAGATC-3'	59	KpnI
P7	5' -TGGTGGCG GGTa CCGTAGTC-3'	60	KpnI
P6	5' -TTCTAAG GtAc CAAAGCTTTGCCCCA-3'	60	KpnI
P5	5' -CTTTAGAACCG GGTa CCAAAGTCTCT-3'	60	KpnI
P4	5' -GACTGC GGt ACCACTAGCAGCG-3'	60	KpnI
P3	5' -CTGGCAGC GGTAc CAGCCACA-3'	60	KpnI
P2	5' -AGTAACAGC GGtAc CTACAGCGG-3'	61	KpnI
P1	5' -GAGTGT GgTacc CGATGGCCTG-3'	59	KpnI
Pa	5' -TCTTGATATC CTCGAGG TCCCGAGG-3'	59	XhoI

Table A.2. Séquences des amorces pour mutagenèse dirigée du gène *PIMT*. Pour les amorces Pimtantil et Pimtanti2, des mutations ponctuelles ont été insérées (en minuscule et caractère gras) afin de créer un codon stop juste après (Pimtantil) et avant (Pimtanti) l'épitope myc. Les amorces Pimtsens et Pimtantil ont été judicieusement choisies puisqu'elles contenaient déjà des sites de restriction pour les enzymes EcoRI et EcoRV (en majuscule et caractère gras). Ces sites de restriction ont permis lors du clonage d'orienter les inserts dans le vecteur d'expression pCMV6 digéré par les mêmes enzymes. Pour les amorces des mutants C43A, C95A, C102A et C95A/C102A, des mutations ponctuelles (en minuscule et caractère gras) ont été insérées afin de muter les codons cystéines en alanines (voir Figures A1.3 et A1.4).

<i>Mutants</i>	<i>Amorces</i>	<i>Séquences</i>
WT-myc	Pimtsens	5' -ATAGGGCGGCCGGAATTCGTCGACT-3 (EcoRI)
	Pimtantil	5' -GTAATCCAGGATATCATTGCTtaCAGATC-3' (EcoRV)
WT	Pimtanti2	5' -CGTACGCGTttaCTTCCACCTGGACCACT-3'
C43A	Pimtcys43sens	5' -CCCACTATGCAAAAgcTAACCCATACATGG-3'
	Pimtcys43anti	5' -CCATGTATGGGTtagcTTTTGCATAGTGGG-3'
C95A	Pimtcys95sens	5' -AATCCTTACTGCAGcTTTTGCACGTATGGT-3'
	Pimtcys95anti	5' -ACCATACGTGCAAAAgcTGCAGTAAGGATT-3'
C102A	Pimtcys102sens	5' -GCACGTATGGTTGGAgcTACTGGAAAAG-3'
	Pimtcys102anti	5' -CTTTTCCAGTAgcTCCAACCATACGTGC-3'
C95A/C102A	Pimtcys95102sens	5' -TACTGCAGcTTTTGCACGTATGGTTGGAgcTACTGGAA-3'
	Pimtcys95102anti	5' -TTCCAGTAgcTCCAACCATACGTGCAAAAgcTGCAGTA-3'

Figure A.1. Éléments de réponses du promoteur du gène *PIMT*. La région -2073 à +230 du promoteur a été analysée par bio-informatique en utilisant le logiciel TFSEARCH. Plusieurs éléments de réponses ont été identifiés et représentés sur le promoteur par surlignement ou en italique. Les éléments de réponses SREBP, NF- κ B, CREB et NRF2 sont respectivement identifiés par les couleurs mauve, vert, turquoise et rouge. Le codon ATG est mis en caractère gras.

Figure A.2. Représentation schématique des mutants délétionnels du promoteur *PIMT*.

A) Positions exactes des mutants P1 à P8 du promoteur *PIMT* ainsi que les éléments de réponses SREBP, NF- κ B, CREB ET NRF2. Le WT (« wild-type ») représente la séquence complète de la région -2073 à +230 du promoteur. B) Positions exactes et séquences nucléotidiques des éléments de réponses NRF2. Le score ayant permis l'identification des éléments NRF2 à partir du logiciel TFSEARCH est mis entre parenthèses.

Figure A.3. Séquence en nucléotide et en acides aminés du gène *PIMT*. A) La séquence codante (cDNA) du gène *PIMT* est mise en bleue. Les codons correspondant aux cystéines sont mis en rouge et en caractère gras. La séquence mise en vert représente l'épitope myc (en caractère gras) et flag (en italique). Le codon (alanine) surligné a été muté pour un codon stop afin d'obtenir les mutants avec l'épitope myc uniquement (voire Figure A1.4). B) Séquence en acide aminé du gène *PIMT* dont la légende est la même qu'en A).

Figure A.4. Représentation schématique des mutants du gène *PIMT* obtenus par mutagenèse dirigée. Le clone pour le gène *PIMT* en fusion avec les épitopes myc et flag (mis dans le vecteur pCMV6) a été obtenu de la compagnie Origene (Rockville, MD). Les différents mutants en fusion ou non avec l'épitope myc ont été obtenus par mutagenèse dirigée en utilisant des amorces spécifiques (voir table A1.2).

tacggaagcactgcatgtaaatgcaatccatctgggtcagcttttagagttaccagtttcc
p300/ GR SRY (-) AP-1 (+/-) C/EBP

tatcaaggatttgactttttttcttccaaatggaagatcatcaagaaactgtagaaa
GATA-1 (-) HNF-3b/ RORα p (-) C/EBP (-) C/EBP

gatgaaatggaaaatattaagtgggttacagtcctcaaatcaacaattttattcatgttta
Nkx-2/ CdxA Tcf-1 (-) Sox-5/ HNF-3b (-) CdxA

atattgaagttaaagaacactgttttggccaggcacggtgggtcacgcctgtaatccagc
CREB C/EBP p300 (-)

actttgggaggccaaggcaggcagatcacgaggtcaggagttcaagaccagcctgggtcaa
Lcf-1 GATA-1 (-) CdxA p300 CdxA Sp1

catggtgaaacccctgtctctactaaaaatacaaaaatatttagctgggcatggtggtgcgt
GATA-1 (-) / Sp-1 (-) Sox-5 HNF-3b GR (-)

gcctgtgaattccagctactcgggaggctgcggcagaatttgcctggaacggggacctgggag
C/EBP Lcf-1 CdxA (-) Lcf-1

gtggagggttgcaatgagccaagatcatgccactgcattccagcctgggctacagagtgtag
AP-1 (+/-) SREBP Oct-1

actcgtctcaatcaaaagcaaaaaaacaaaaagaaaccagttttgcctgtagtttcatt
p300 SRY SRY SRY SRY (-)

tatggtcacataatcccagaaaaataggtaatgttgattttggattggaagcaggccagtg
CdxA (+/-) RORα ph NF-2 (-) C/EBP

tcacattttacaaaatcggataagaactagaatttgaaaattgtgctgatatatgtggac
C/EBP (+/-) CdxA (-) CdxA (-)

agatgtcttagctttgtttcttctaaaaagattactggaggccgggagctgtgtggctcatg
MyoD HNF-3b AML-1a
GATA (-) SRY (-) CdxA Sp-1 (-) SREBP/ RORα ph

cctgtaatcccagcactttgggaggccgaggccgggcggatcataaggtcaggagatcgag
Ik-2/3 (-) Ik-2 Sp-1 MEF-2 CRE-BP GATA-1/2/3 Sp1

accatcctggctaacacggtgaaacccctgtctctactaaaaatcaaaaaaatagccggg
GATA-1/2 (-) GATA (-) S8

cggtgggtggcgggtgcctgtagtcctcagctactcgggaggtcaggcaggagaatggcctg
AML-1a AML-1a NF-E2 HSF1

aacctgggaggcggagccttcagtgagccgagatcgccactgcactccagtcctgggcg
Lcf-1 p300 GATA (+/-) p300

acagagcgagactccgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagttactggacta
ZfD GATA Lcf-1 SRY/ HNF-2/ HNF-3b AP-1 (+/-) / NF-E2 (-)

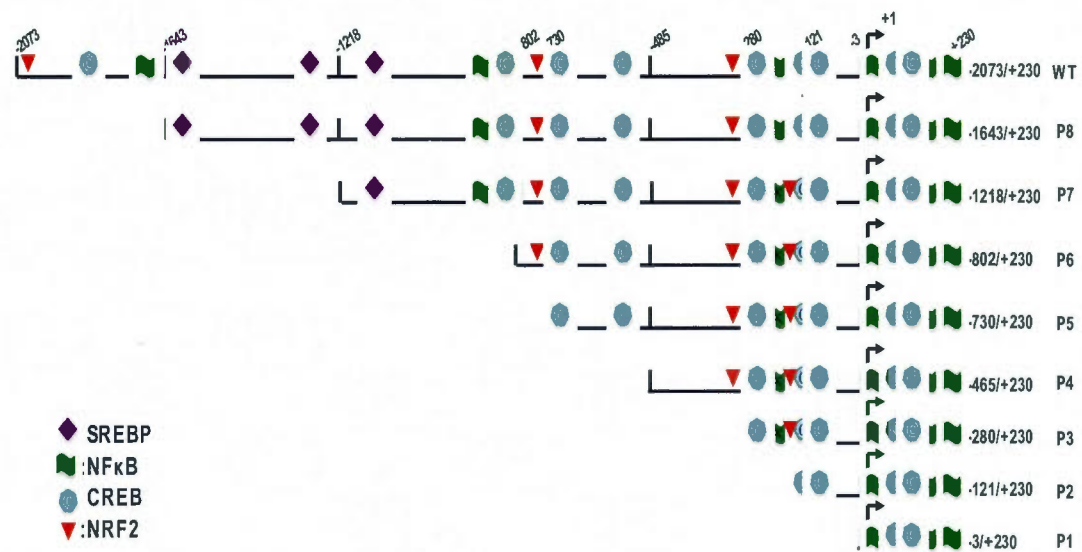
gatgatggctggattctgtcagttctcaggtctaattaggagtcagcgatttgagcgcgac
GATA S8 (+/-) / Oct-1 (+/-) Ahf/ Ar (-)

aagcaatgttctcagtgagcttctcactcatggtcttgagagctgagagcaataaagcc
AP-1 (-) AP-1 (-) / NF-E2 C/EBP Pbx-1/ HNF-3 (-)

acggtggaatttgtgaggcttaattaggtggaaatgcacacttacgtcgggagaataaca
 — CdxA — Oct-1 — c-Rel (+) — CREB (+/-) —
 AML-1A (-) AML-1a (-) GATA-1/2 (-)
 cgttcaccaaaaggacacagtggtatatttttaaccaatcgcaactctgtacgttggtatta
 — C/EBP (-) — HNF-1 (-) / Sox-5 (-) —
 HNF-3b RREB-1/ p300 (-) MZF1 (-)
 ttctaaggaggagcaaagctttgccccaaacccccacccccatgtcctggtactcttccactc
 CdxA E2F MZF1 (-) / Sp1 (-) NF-2 (-)
 Tgagagcttttagaaccggggttccaaagtctctgcttagcctaacagtgacgtgcttgc
 CdxA CdxA C/EBP (-) C/EBP Ar nt
 CdxA (-) E47 CREB
 acaaagccagaggccggtgtactcgggttagagagggcctttgtcgttggtttttattct
 Th1/ E4 ZI D AML-1a Pbx-1 (-)
 CdxA (-) CdxA (-) AP-1 (-) / CdxA (-) C/EBPb
 tattgtattatttcgggtccaccgacccaaatatttagtcaactgggtgggaggttagg
 SRY (-) / Sox-5 HNF-3b (-) / NGF-1 (-) Sp1
 Sox-5/ SRY CDP CR (-)
 acggatgaagcccacggtctaacaatctggacatctataggagcagatccgccgctcgaa
 CREB GATA-1/2 (-) / YY1 GATA-1/2 (+/-) E2F (-)
 acagctgaccagcgacgactgcggaaccactagcagcgtctgcacagatcgaccccgcc
 AP-1 AML-1a (-) C/EBP (-) Sp1
 atcccgccgtcccgctcgggtgaccggagacacagccgggaacgcgactgatcaggctacc
 Sp1 c-El s- Ik-2 GATA-1 (-) E1 k-1
 gagccgggcccgcagggcgaaagcgggtgcgggtccgaggcctcagaaagggacacgcagcag
 IRF-2 Sp1 GATA-3
 cggaagtggcgctgactcagcccgccctccctgcagtcacctggcagcggtagcagccac
 NF-2 (-) NF- E2/ AP-1 (+/-) p300
 AP-4/ Sp1 p300 (-) SP1 (-) AML-1a
 agggggcgggcggtcggccacacgcctccccgccttcggccccacccggcgccacccta
 Sp1 MZF1 (-) Sp1
 agccgcgcggcgctcacagagcgcagtcgctgccgcgggggatgccgggagcgcgcagtgcc
 CREB (-) / AP-1 (-) NF-2 GATA-1/2
 Sp1 MZF1
 ggcagcggcgggcgacgagtaacagcggcagctacagcggggacgcgagcggggcggtg
 CREB (-) MZF1 Sp1/ CREB
 Lyf-1/ E47
 acggtgtgggaggtggtctcactcttgggaaaactgctgggcacgcgtcgtcgcgctgaag
 AML-1a AML-1a C/EBP (+/-) / P300 RORal p (-) / C/EBP E2F (-)
 HSF2 (-) / E47
 gtggttctgtacctgctccgagtggtgcttagcgcgctggaaatccggcggcgccagc
 AML-1a GR GATA (-) GATA-1/2 E47 (-) GATA-2 (-) / c-El s
 cactcggagctaataccacaatctccgcagtaagtgccacctccgccgttgtagggcagc
 C/EBP (-) / CREB (-) NF-2 (+) / CdxA (-) Sp1 (-) AP-4
 tggggcagggctgggcctggaccgggtccccctgggcgctccggaacgttctgtctgtccc
 MZF1 (-) HSF2 (+/-) MZF1 (-)
 Sp1 c-Rel NF-2 v- Myb
 cgcgcgcctgttgagggttcgggcgcagagttgccccggtagtcccgaaacggcgctgcg
 c-Myb E2F c-Rel (+)
 cttgcagtcgcctccctcgggacc

Figure A.2

A



B

-1983 à -1973: aatggaagat (77,2)
 -764 à -755 : ctcttccact (82,5)
 -335 à -326 : agcggaagtg (91,2)
 -172 à -163 : gccgggagcg (77,2)
 +184 à +193 : cccggtagtc (75,4)

Figure A.3

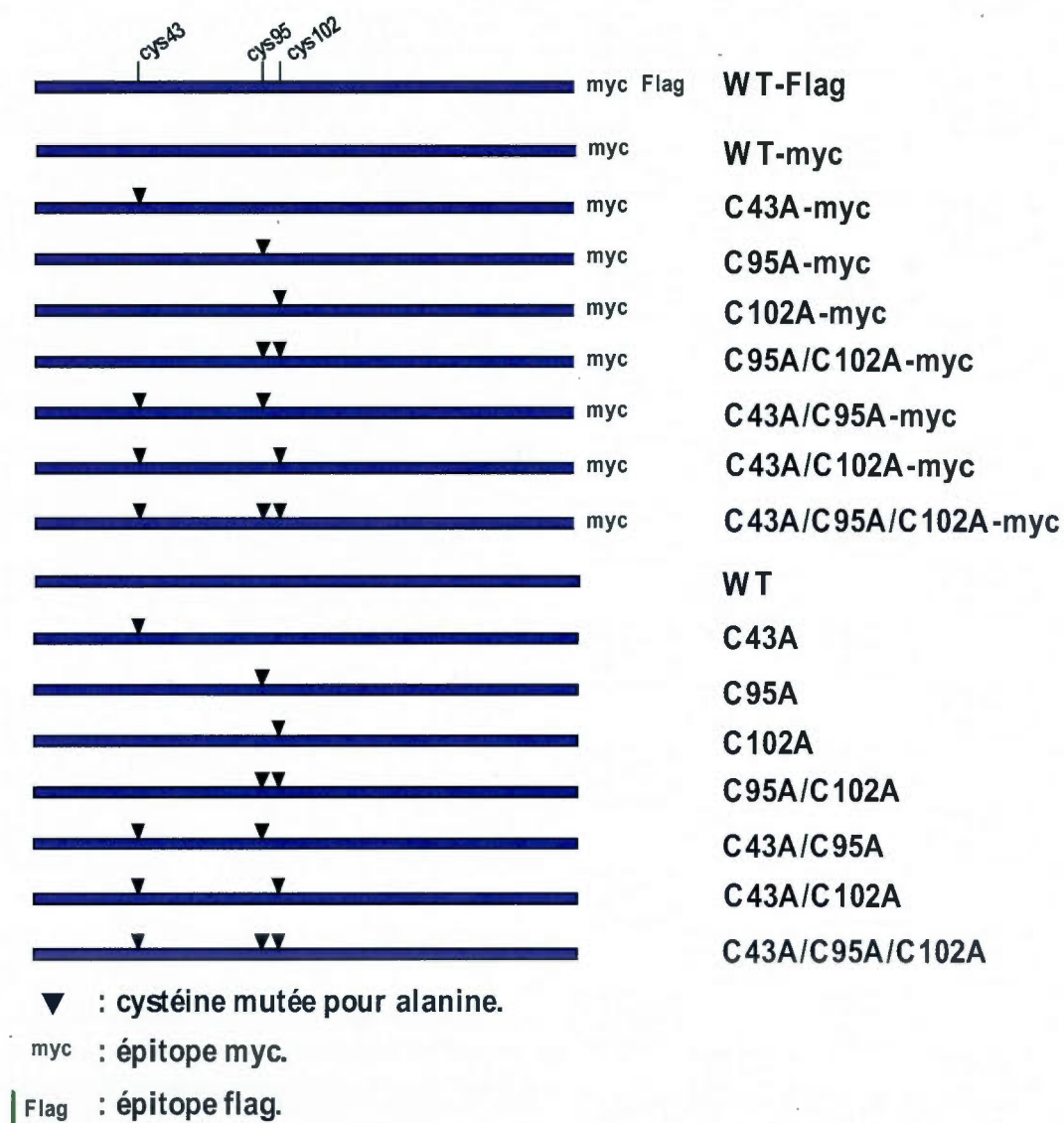
A

GACGTTGTATACGACTCCTATAGGGCGGCCGGAATTTCGTCGACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTG
 CCGCCGCGATCGCCATGGCCTGGAAATCCGGCGGCCAGCCACTCGGAGCTAATCCACAATCTCCGC
 AAAAATGGAATCATCAAGACAGATAAAGTATTTGAAGTGATGCTGGCTACAGACCGCTCCCACTATGC
 AAAA**TGT**AACCCATACATGGATTCTCCACAATCAATAGGTTTCCAAGCAACAATCAGTGCTCCACACA
 TGCATGCATATGCGCTAGAACTTCTATTTGATCAGTTGCATGAAGGAGCTAAAGCTCTTGATGTAGGA
 TCTGGAAGTGGAATCCTTACTGCA**TGT**TTTGCACGTATGGTTGGA**TGT**ACTGGAAAAGTCATAGGAAT
 TGATCACATTAAAGAGCTAGTAGATGACTCAATAAATAATGTCAGGAAGGACGATCCAACACTTCTGT
 CTTCAGGGAGAGTACAGCTTGTTGTGGGGGATGGAAGAATGGGATATGCTGAAGAAGCCCCCTTATGAT
 GCCATTCATGTGGGAGCTGCAGCCCCTGTTGTACCCAGGCGCTAATAGATCAGTTAAAGCCCGGAGG
 AAGATTGATATTGCCTGTTGGTCCTGCAGGCGGAAACCAAATGTTGGAGCAGTATGACAAGCTACAAG
 ATGGCAGCATCAAAATGAAGCCTCTGATGGGGGTGATATACGTGCCTTTAACAGATAAAGAAAAGCAG
 TGGTCCAGGTGGAAGACGCGTACGCGGCCGCTC**GAGCAGAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGCGA**GC
AAATGATATCCTGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTTTAA

B

MAWKSGGASHSELIHNLRKNGIIKTDKVFVEMLATDRSHYAK**C**NPYMDSPQSIGFQATISAPMHAYA
 LELLFDQLHEGAKALDVSGSGILT**C**FARMVG**C**TGKVIGIDHIKELVDDSIINNVRKDDPTLSSGRVQ
 LVVGDGRMGYAEAPYDAIHVGAAAPVVPQALIDQLKPGGRLLPVGPAAGNQMLEQYDKLQDGSIKM
 KPLMGVIYVPLTDKEKQWSRWKTRTRPLE**EQKLISEEDLA**AND**ILDYKDDDDKV**stop

Figure A.4



ANNEXE B

AUTRE CONTRIBUTION – COLLABORATION AVEC LE Dr. BORHANE ANNABI
(UQAM)

SIGNAL TRANSDUCING FUNCTIONS FROM THE MEMBRANE BOUND MATRIX
METALLOPROTEINASE MT1-MMP IMPACT ON THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE
TRANSLOCASE TRANSCRIPTIONAL REGULATION

Louis-Charles Levros, Amélie Vézina, Asmaa Sina, Éric Rassart et Borhane Annabi

Expériences en cours

2012

Les protéines G6PT («Glucose-6-Phosphate Transporter») et G6Pase («Glucose-6-Phosphatase») font partie d'un système enzymatique ancré à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et jouent un rôle important dans l'homéostasie du glucose (Lou et al., 2006). G6PT permettrait le transport du G6P du cytoplasme vers la lumière du RE (Chou et al., 2002) tandis que la G6Pase hydrolyserait le G6P en glucose et phosphate inorganique (Arion et al., 1980; Nilsson et al., 1978). Plusieurs mutations génétiques ont été identifiées sur ces gènes et seraient impliquées dans les maladies de stockage du glycogène telles que la Glycogénose de type I (GSD I: «Glycogen storage disease type I») ou maladie de von Gierke (Pan et al., 1998). La G6Pase n'est exprimée que dans les tissus glycogéniques tels que le foie, les reins et le petit intestin alors que l'expression de G6PT est ubiquitaire (Lin et al., 2000). Notamment, on retrouve une autre isoforme de G6PT exprimée dans le cerveau humain (Chou et al., 2002; Middleditch et al., 1998). L'équipe du Dr Annabi a démontré que l'inhibition de la fonction de G6PT dans des glioblastomes humains, soit par la technique d'ARN interférant soit en utilisant des inhibiteurs spécifiques tel que l'acide chlorogénique (CHL), causerait la mort de ces cellules tumorales (Belkaid et al., 2006a; Belkaid et al., 2006b; Belkaid et al., 2007). De plus, lors d'une précédente collaboration, nous avons montré que le facteur de transcription HIF-1 α régule l'expression génique de *G6PT* en se liant à son promoteur (Lord-Dufour et al., 2009). G6PT serait une molécule prosurvie pour les cellules tumorales en permettant leur adaptation à des conditions hypoxiques et inflammatoires. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation et la fonction du gène *G6PT* mènerait au développement de stratégies thérapeutiques ciblant les fonctions de cette protéine.

Le but de cette collaboration avec l'équipe du Dr Annabi du Département de Chimie à l'Université du Québec à Montréal (UQAM) a été d'étudier les mécanismes de régulation du gène *G6PT* au niveau du promoteur et de déterminer les éléments de réponse importants dans la régulation de l'expression génique dans des conditions inflammatoires et hypoxiques. Une analyse bio-informatique du promoteur de *G6PT* (-1200 pb à +1) murin et humain a été réalisée en utilisant le logiciel TFSEARCH (Figure B.1A et B). Une attention particulière fut accordée aux éléments NF- κ B (indiqués en rouge) présents en grand nombre sur le promoteur des deux espèces. L'analyse montre aussi que plusieurs éléments de réponses sont conservés

entre le promoteur des deux espèces, entre autres : HNF/ HIF et GRE indiqués respectivement avec les couleurs gris et bleu. Les mutants délétionnels du promoteur humain ont été construits par la technique de PCR et clonés dans le vecteur pGL3, en amont du gène rapporteur luciférase. Ainsi, des délétions progressives ont été créées à partir du promoteur complet (WT) pour les éléments de réponse NF- κ B (Figure B.2A).

Ces constructions ont été transfectées dans les cellules de glioblastomes humains U87 cultivées en condition normale, inflammatoire (Phorbol 12-myristate 13-acetate : PMA et Tumor necrosis Factor- α : TNF- α) ou hypoxique (Chlorure de Cobalt : CoCl₂) dont les résultats préliminaires sont présentés à la Figure B.4. Nous avons aussi regardé l'expression de COX-2, une molécule pro-inflammatoire qui joue un rôle important dans la carcinogénèse (Lord-Dufour et al., 2009), en présence ou non de CHL (Figure B.3) ou d'un siRNA spécifique dirigé contre *G6PT* (siG6PT; Figure B.4). Nous montrons qu'en présence de PMA, TNF- α et CoCl₂, l'expression de COX-2 est fortement induite comparativement au contrôle où elle est absente. De plus, cette induction est réprimée en présence de CHL d'une manière dose-dépendante. Ce même effet est observé en présence de siG6PT.

L'élaboration de cette étude expérimentale a été réalisée par le Dr Borhane Annabi. Asmaa Sina a effectué les expériences d'immunobuvardage afin d'analyser l'expression de COX-2 dans la réponse inflammatoire et hypoxique, en présence ou non d'inhibiteur de G6PT (CHL et siRNA). J'ai effectué la construction des mutants du promoteur du gène *G6PT*, comprenant aussi le design des amorces et l'analyse par bio-informatique des éléments de réponse. J'ai aussi effectué les tests de luciférase afin de déterminer les éléments importants impliqués dans les conditions inflammatoires et hypoxiques. Amélie Vézina a contribué en partie dans les expériences de clonage et les tests de luciférase.

Table B.1. Séquences des amorces ayant permis l'amplification par PCR des mutants délétionnels du promoteur *G6PT*. La température de fusion (T_m) a été calculée en utilisant le logiciel « oligo calculator ». Pour chacune des amorces, des mutations ponctuelles ont été insérées (en minuscule) afin de créer des sites de restrictions (caractère gras) pour les enzymes *XhoI* (sens) et *HindIII* (anti) nécessaire pour l'orientation des inserts lors de la ligation dans le vecteur pGL3 digérés par ces mêmes enzymes.

<i>Mutants</i>	<i>Séquences</i>	<i>T_m (°C)</i>
G6PT_WT_sens	5' -GAGGACCCACGGGGCTGGGCA-3'	64
H1_sens	5' -TTCTG CTCgAG TTGCTTTCCCAATT-3'	56
H2_sens	5' -GGGACGGTTGTGCC CTcgAG CCCGAA-3'	67
H3_sens	5' -ACC CTcgAG CCCCCAGCTA-3'	58
H4_sens	5' TGTGACAC CtcGaG ACCTGAACTG-3'	59
H5_sens	5' -CCGTGAATG ctcGAG AAGGTTC-3'	57
H6_sens	5' -AATC CtcGaG ACACAGGGTGCT-3'	57
H7_sens	5' -TACAGT CtcGaG CTCAGTAATCT-3'	53
H8_sens	5' -AATGATT cTCgAG AAGGCGGCTATAAA-3'	57
G6PT_anti	5' -CAT AAGctt GGTAGAAAAGAGCAGGC-3'	58

Figure B.1. Éléments de réponse du promoteur du gène *G6PT*. La région -1200 à +3 du promoteur de *G6PT* murin A) et humain B) a été analysée par bio-informatique en utilisant le logiciel TFSEARCH. Plusieurs éléments de réponse ont été identifiés et représentés sur le promoteur par surlignement ou en italique. Le codon ATG et la boîte TATA sont en caractère gras. Les éléments de réponses NF- κ B, HNF/HIF et GRE sont respectivement identifiés par les couleurs rouge, grise et bleue. Ces éléments, parmi plusieurs, sont conservés entre les deux espèces.

Figure B.2. Représentation schématique des mutants délétionnels du promoteur *G6PT* humain. A) Positions exactes des mutants H1 à H8 du promoteur *G6PT* ainsi que les éléments de réponses NF- κ B. Le WT (« wild-type ») représente la séquence complète de la région -1200 à +3 du promoteur. B) Activité luciférasique des différentes constructions du promoteur *G6PT* dans les cellules de glioblastomes humains U87 cultivées en condition normale, inflammatoire (PMA et TNF- α) ou hypoxique (CoCl₂). La construction pGL3 représente le contrôle négatif (vecteur vide).

Figure B.3. Effet de CHL sur l'expression de COX-2 en conditions inflammatoire et hypoxique. L'expression de COX-2 a été analysée par immnuobuvardage dans les cellules de glioblastomes humains U87 cultivées en condition normale, inflammatoire (PMA et TNF- α) ou hypoxique (CoCl₂) en présence de quantité croissante d'inhibiteur de G6PT (CHL).

Figure B.4. Effet de siG6PT sur l'expression de COX-2 en conditions inflammatoire et hypoxique. L'expression de COX-2 a été analysée par immnuobuvardage dans les cellules de glioblastomes humains U87 cultivées en condition normale, inflammatoire (PMA et TNF- α) ou hypoxique (CoCl₂) en présence de siRNA spécifique dirigé contre *G6PT* (siG6PT).

Figure B.1

A

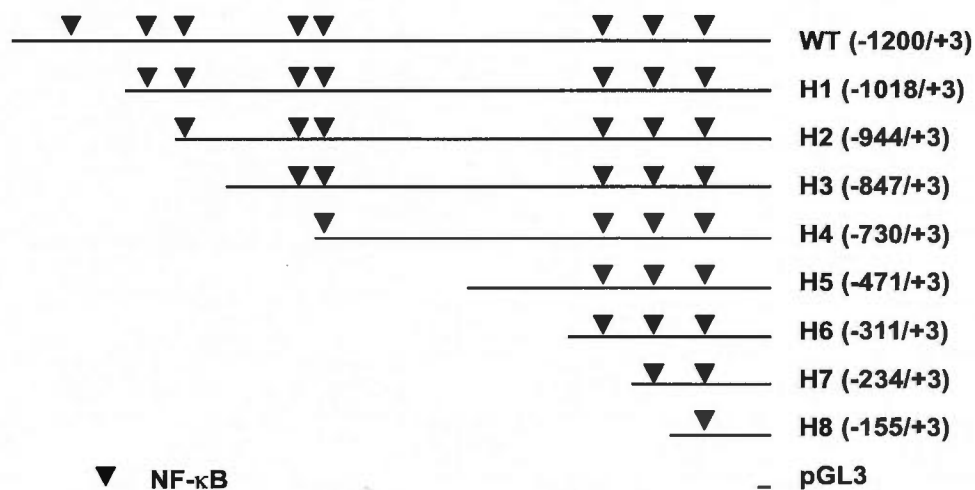
GCTCGGCAGGTGGCAAGCGG Sp1 AP1
 CGCCGCTGCCCAT OCT GACT GC CAGAGCCTAGGCTGCCA
E47 (MYO) Arnt EBS
 GAGCGAGGGGCTCCCGAGGCTACGTGCGGCTTCTCTCGCCTACGCCTTGTGCTCCAGCG
NF-kB HIF-1 Egr-1 AML-1a
 GCTGTGCAGCGGAGCAGAAAGCT GCGGTGGG GTGCTTCGGGGAC CCACAGCCCCGCAGTA
AML-1a Ahr: Arnt NF-kB Sp1 STRE
 CGGACCCCTACTGATGTCGCAGGGTAATAGGGATCCAGAGGCAGTTCCAAGGGGGTCTC
Ik2 NF-kB
 ATCCAGACCTAAGCCCTAGGCGCGCCTTCTGCGTGTCAATTGCAGGGTGAAGTGAAGGGGCT
MZF-1 HSF-1 NF-kB
 TGTCCCCCGTTTAATTTTGCAACTACTGCAGTTATCTCGCTCCTTACCTACTGTTGTTT
C/EBP GATA-1
 CTTGCACATTTTCAGTGACAGAGGCCAGCCTTAGTGGAAGGAGAATGGGAATTCAG
STAT SRY NF-kB
 AAATAACGATAGGCTTTAAGAACTTTTACTATGGTGCCTCATTTGTGTTTTACTATTTA
GATA-2 AML-1a AML-1a HNF-3b
 CTTACTAGGTCTAATTTATGTATCTACCTTTTATCACTGTGTGTATAAGGAAAGTGTATG
GATA-1 GATA-2
 CGCTGTTCCCTACCACCATGAGGAGTTCAAGAAATATATCCCCCAATGAAGGGGATACCT
Ik2 GATA-2 C/EBP NF-kB
 ATTAGGAACTGTACTCCATTGTGTGCTAAGCATTTGGTGAAGGCTCAGCAGTGGGTGTG
SRY GRE Pbx-1 AML-1A
 GGGTTGTTTAAAGGTATGTGGTTGATTGAATGAACCTGGGGGGTAGGAACCGATCTAGT
AML-1a AML-1a
 GCCTTTTACAATGTCCGGCAGCCTGGCACCAGCAAGGAACCTGAGAGAATGAGAAAGTTC
AML-1a EBS HSF-1
 ATTGACCAAGGGAGTAGGGCTATACTGAGAGCTTGCTCTGCTCATCCTACCCGAGCCTCC
P300 cdxA NF-kB
 CCTGGGCTTGTGCAGACAAAAGTAATTAGGCTGAGCCTTTAATCAAGCTGGCTTCACAG
MZF-1 S8 (OCT-1) AML-1a (MYO)
 GCAAGAAGACTTGGGAAGGAGGGAAGGGCAAGCAGT CCTGGGGA CCCTCTCCTCCCCCG
Ik2 EBS NF-kB Sp1
 GTTTGGCTCTCAGTAACCTGTTTTCTTGTCTCTCTCAGGACACTGGGTTCCTGGTTGCT
HNF3 Evi-1 EBS GRE
 GCCCCAGGCTTAATGATTGTCCAGAAGCGGCTATAAAGAGCCTGGGTGGAGGAGAGAGA
HNF1 TATA Box
 AAGCGCACAGAAAAACACAGCTCAGCAGATCCAGGCACTAAAGAGAGCTAGCTGCAAGCA
C/EBP E2F HNF3
 GGAGCAGTCAAGAA CTGTGGTCAGAA GTACTGGAGTGGGCCAGCAGGGCCAGCTTTTTTC
AML-1 p300 CdxA
 TACCATG

B

GAGGACCCACGGGGCTGGGCAGGTGCCACGAGCCCGCCGCTCTTCGCCGCCCGCCGCTT
 CTCCTCTCTCCCGCCCGCCGCTGGCCC**MYOD (E47)****MZF-1**
 AAGCGCGGGGCTCCGGGAGAATACGTGCGGTGCGCCGCTCCGCGTGCGCCTACGCCTTC
 TGCTCCAGTTGCTTTCCCAATTGAGCGGAAAAGCCG**EBS****HIF****AML-1a****Sp1****Egr-2**
 GGGACGGTTGTGCCCTGCAGCCCGAA**Ik2****NF-KB****Arnt**
 CAGTCCCTCTGCTTGCGGGCCCTGCCAACGTCCACAGGTTGGAAACCAGACCCTGCAGC
 CCCCAGCTAGCCCGAAGGAAGCCAGACTGACGTGCGAGGGTAATGGGGACCCAGAGGTA
 GCTCTGTGGGGCCCCATCAGGACCTCAGCCCTTAGCGGGGCTTTCTGTGTGACACCGTGG
 GACCTGAACTGGGGAGGTCCCCCTTGACAGAATTACAAGGGGCAACTGTAG**GATA-1****AML-1a****NF-KB****AP-1**
 TAAATCTATTATGTGCTAAGTATTGAGAGTTCCACGGATTGAGGCCCTCTCTAGAAGGCT
 TAGAAGTGGGGTAGCCGGGGTATGTGTCTGACTTTGTGTTTTGGTGCGGTGGTGGTGAGT
 GGGTGTAGAACTAATAAGTGCCAAGTGCAGTGCCTGTCACTAGTAAGTTAATAAACCTT
 CCGTGAATGAATGAGAAGGTTCTGTGACTGAGGGAGCAGGGCTAGAGAGGGCATCTCTGC
 TCATCCCA**SREBP****Sp1****STAT****HSF2****AP1****S8/ Oct-1/ cdxA**
 ATCAAAGCTGGTTTCACAGGCAAGCAGACATGATAGAGGAGGTAAAGGCAGAAATCCTGG
 GGACACAGGGTGCTGGCCTGGCTCACAGGCATGCCTCTTCCGGG**SRY****HNF3B****GATA-1****cdxA**
 TACAGTTTGGCGCTCAGTAATCTCTTGTCTTCTTGTCTCCCTCAGGACACTGGGTCCCTT
 TGGAGCC**MZF-1****AP1****E2F****cdxA****HNF3b****GRE****NF-kB****MZF-1****HNF1(Oct 1/ cdxA)****TATA Box****Sp1**
 TGGGTGGAGGAGGGAGCAGAAAAACCCAACTCAGCAGATCTGGGAAGTGTGAGAGCGGC
 AAGCAGGAAC**EBS****NF-kB****Ik2****E2F****ATG**
 ATG**AML-1a****C/EBP****SMAD****cdxA**

Figure B.2

A



B

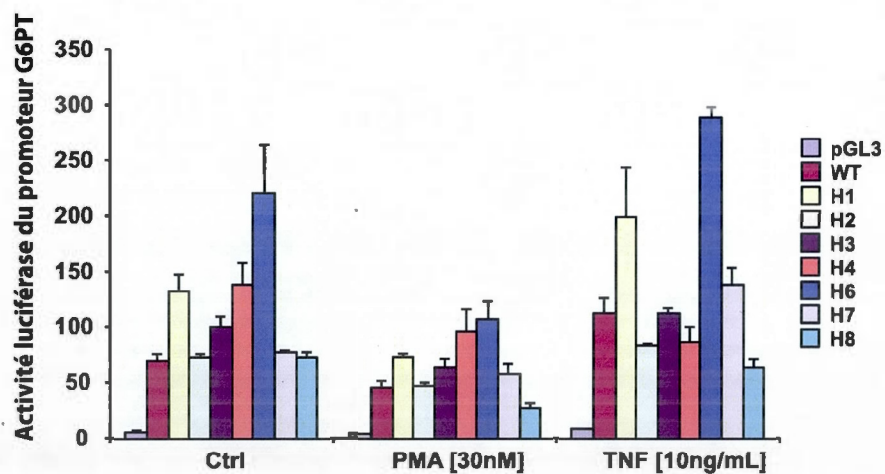


Figure B.3

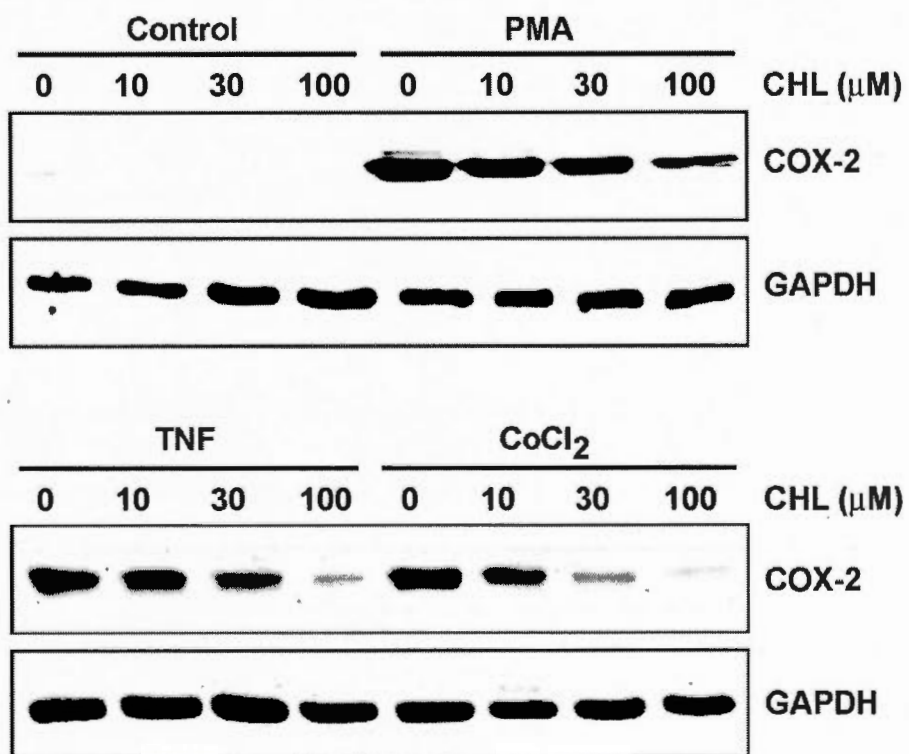
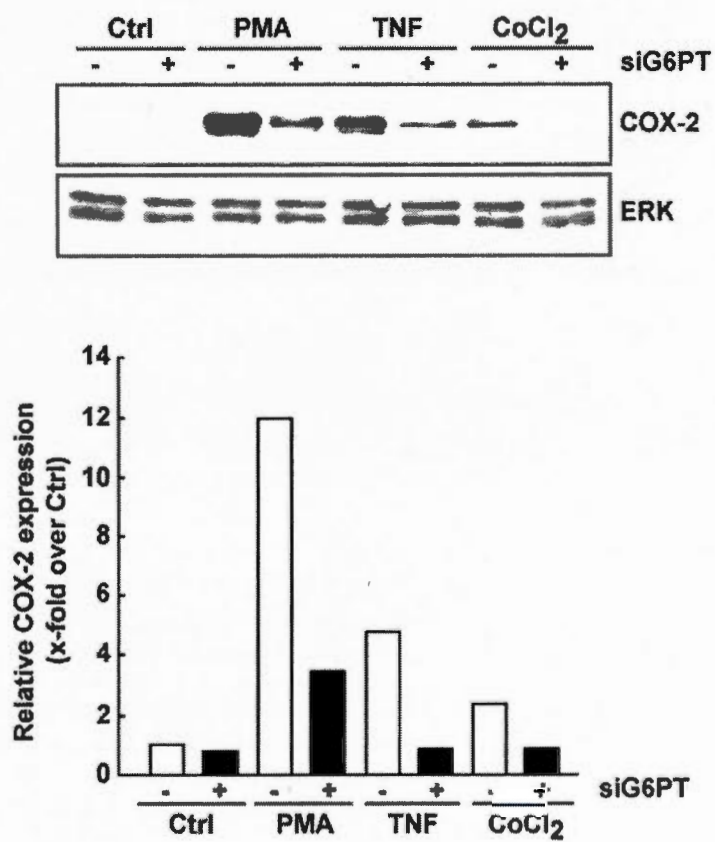


Figure B.4



ANNEXE C

AUTRE CONTRIBUTION

EVIDENCE FOR TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE GLUCOSE-6-
PHOSPHATE TRANSPORTER BY HIF-1ALPHA : TARGETING G6PT WITH
MUMBAISTATIN ANALOGS IN HYPOXIC MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Lord-Dufour, S., Copland, I. B., Levros, L. C., Jr., Post, M., Das, A., Khosla, C., Galipeau, J.,
Rassart, E., and Annabi, B

Stem Cells 27, 489-497

2009

ANNEXE D

AUTRE CONTRIBUTION

MODULATION OF APOLIPOPROTEIN D EXPRESSION AND TRANSLOCATION
UNDER SPECIFIC STRESS CONDITIONS

Sonia Do Carmo, Louis-Charles Levros Jr, Éric Rassart

Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1773 : 954-969

2007

RÉFÉRENCES

- Ahmad, N., and Lingrel, J. B. (2005). Kruppel-like factor 2 transcriptional regulation involves heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and acetyltransferases. *Biochemistry* 44, 6276-6285.
- Arbour, N., Cote, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N. R., and Talbot, P. J. (1999). Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. *J Virol* 73, 3338-3350.
- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., and Talbot, P. J. (2000). Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol* 74, 8913-8921.
- Arion, W. J., Lange, A. J., Walls, H. E., and Ballas, L. M. (1980). Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *The Journal of biological chemistry* 255, 10396-10406.
- Asefa, B., Klarmann, K. D., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Keller, J. R. (2004). The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. *Blood cells, molecules & diseases* 32, 155-167.
- Aspinall, J. O., Bentel, J. M., Horsfall, D. J., Haagensen, D. E., Marshall, V. R., and Tilley, W. D. (1995). Differential expression of apolipoprotein-D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *J Urol* 154, 622-628.
- Atadja, P. W., Stringer, K. F., and Riabowol, K. T. (1994). Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging. *Mol Cell Biol* 14, 4991-4999.
- Ayrault Jarrier, M., Levy, G., and Polonovski, J. (1963). [Study of Humanserum Alpha-Lipoproteins by Immunoelectrophoresis]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 45, 703-713.

- Bacolla, A., and Wells, R. D. (2004). Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease. *The Journal of biological chemistry* 279, 47411-47414.
- Balbin, M., Freije, J. M., Fueyo, A., Sanchez, L. M., and Lopez-Otin, C. (1990). Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem J* 271, 803-807.
- Banach-Orlowska, M., Pilecka, I., Torun, A., Pyrzynska, B., and Miaczynska, M. (2009). Functional characterization of the interactions between endosomal adaptor protein APPL1 and the NuRD co-repressor complex. *Biochem J* 423, 389-400.
- Belgard, T. G., Marques, A. C., Oliver, P. L., Abaan, H. O., Sirey, T. M., Hoerder-Suabedissen, A., Garcia-Moreno, F., Molnar, Z., Margulies, E. H., and Ponting, C. P. (2011). A transcriptomic atlas of mouse neocortical layers. *Neuron* 71, 605-616.
- Belkaid, A., Copland, I. B., Massillon, D., and Annabi, B. (2006a). Silencing of the human microsomal glucose-6-phosphate translocase induces glioma cell death: potential new anticancer target for curcumin. *FEBS Lett* 580, 3746-3752.
- Belkaid, A., Currie, J. C., Desgagnes, J., and Annabi, B. (2006b). The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell Int* 6, 7.
- Belkaid, A., Fortier, S., Cao, J., and Annabi, B. (2007). Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 9, 332-340.
- Belloir, B., Kovari, E., Surini-Demiri, M., and Savioz, A. (2001). Altered apolipoprotein D expression in the brain of patients with Alzheimer disease. *J Neurosci Res* 64, 61-69.
- Benmerah, A. (2004). Endocytosis: signaling from endocytic membranes to the nucleus. *Curr Biol* 14, R314-316.

- Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. E., and Pasinetti, G. M. (1995). Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* 33, 174-178.
- Bhakat, K. K., Izumi, T., Yang, S. H., Hazra, T. K., and Mitra, S. (2003). Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *The EMBO journal* 22, 6299-6309.
- Bishop, R. E., Penfold, S. S., Frost, L. S., Holtje, J. V., and Weiner, J. H. (1995). Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. Implications for the origin of lipocalins. *J Biol Chem* 270, 23097-23103.
- Blais, Y., Sugimoto, K., Carriere, M. C., Haagenzen, D. E., Labrie, F., and Simard, J. (1994). Potent stimulatory effect of interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 59, 400-407.
- Blais, Y., Sugimoto, K., Carriere, M. C., Haagenzen, D. E., Labrie, F., and Simard, J. (1995). Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens, glucocorticoids and interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 62, 732-737.
- Blanco-Vaca, F., Via, D. P., Yang, C. Y., Massey, J. B., and Pownall, H. J. (1992). Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 33, 1785-1796.
- Bonavia, A., Arbour, N., Yong, V. W., and Talbot, P. J. (1997). Infection of primary cultures of human neural cells by human coronaviruses 229E and OC43. *J Virol* 71, 800-806.
- Boucher, A., Desforbes, M., Duquette, P., and Talbot, P. J. (2007). Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 123, 258-267.

- Boyles, J. K., Notterpek, L. M., and Anderson, L. J. (1990a). Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 265, 17805-17815.
- Boyles, J. K., Notterpek, L. M., Wardell, M. R., and Rall, S. C., Jr. (1990b). Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat. *J Lipid Res* 31, 2243-2256.
- Brivanlou, A. H., and Darnell, J. E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-818.
- Buchmeier, M. J., and Lane, T. E. (1999). Viral-induced neurodegenerative disease. *Curr Opin Microbiol* 2, 398-402.
- Buchwalter, G., Gross, C., and Wasylyk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324, 1-14.
- Bungard, D., Fuerth, B. J., Zeng, P. Y., Faubert, B., Maas, N. L., Viollet, B., Carling, D., Thompson, C. B., Jones, R. G., and Berger, S. L. (2010). Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science* 329, 1201-1205.
- Burks, J. S., DeVald, B. L., Jankovsky, L. D., and Gerdes, J. C. (1980). Two coronaviruses isolated from central nervous system tissue of two multiple sclerosis patients. *Science* 209, 933-934.
- Burns, K. A., and Vanden Heuvel, J. P. (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* 1771, 952-960.
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., *et al.* (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28, 264-278.

- Camato, R., Marcel, Y. L., Milne, R. W., Lussier-Cacan, S., and Weech, P. K. (1989). Protein polymorphism of a human plasma apolipoprotein D antigenic epitope. *J Lipid Res* 30, 865-875.
- Campisi, J. (2005a). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-522.
- Campisi, J. (2005b). Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* 309, 886-887.
- Chai, J., Baatar, D., Moon, W., and Tarnawski, A. (2002). Expression of serum response factor in normal rat gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol* 53, 289-294.
- Chai, J., and Tarnawski, A. S. (2002). Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* 53, 147-157.
- Chamovitz, D. A. (2009). Revisiting the COP9 signalosome as a transcriptional regulator. *EMBO Rep* 10, 352-358.
- Charron, J. B., Ouellet, F., Houde, M., and Sarhan, F. (2008). The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC plant biology* 8, 86.
- Chauhan, V., Ji, L., and Chauhan, A. (2008). Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease. *Biogerontology* 9, 381-389.
- Chen, Y. C., Pohl, G., Wang, T. L., Morin, P. J., Risberg, B., Kristensen, G. B., Yu, A., Davidson, B., and Shih Ie, M. (2005). Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. *Cancer Res* 65, 331-337.
- Chou, J. Y., Matern, D., Mansfield, B. C., and Chen, Y. T. (2002). Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Current molecular medicine* 2, 121-143.
- Chow, C. W., and Davis, R. J. (2006). Proteins kinases: chromatin-associated enzymes? *Cell* 127, 887-890.
- Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G., and Rombauts, W. (2001). Selective DNA binding by the androgen receptor as a

- mechanism for hormone-specific gene regulation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 76, 23-30.
- Claret, F. X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T., and Karin, M. (1996). A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 383, 453-457.
- Cofer, S., and Ross, S. R. (1996). The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene* 171, 261-263.
- Cohen-Armon, M. (2007). PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends in pharmacological sciences* 28, 556-560.
- Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., and Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Molecular cell* 25, 297-308.
- Conaway, R. C., Brower, C. S., and Conaway, J. W. (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 296, 1254-1258.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Jr., Rimmler, J. B., Locke, P. A., Conneally, P. M., Schmechel, K. E., and et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7, 180-184.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.
- Cristallo, A., Gambaro, F., Biamonti, G., Ferrante, P., Battaglia, M., and Cereda, P. M. (1997). Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *The new microbiologica* 20, 105-114.

- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal* 342 (Pt 2), 249-268.
- Dandoy-Dron, F., Guillo, F., Benboudjema, L., Deslys, J. P., Lasmezas, C., Dormont, D., Tovey, M. G., and Dron, M. (1998). Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem* 273, 7691-7697.
- De Andrea, M., Zannetti, C., Noris, E., Gariglio, M., Azzimonti, B., and Landolfo, S. (2002). The mouse interferon-inducible gene Ifi204 product interacts with the Tpr protein, a component of the nuclear pore complex. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22, 1113-1121.
- Dean, J. L., Sully, G., Wait, R., Rawlinson, L., Clark, A. R., and Saklatvala, J. (2002). Identification of a novel AU-rich-element-binding protein which is related to AUF1. *The Biochemical journal* 366, 709-719.
- del Valle, E., Navarro, A., Astudillo, A., and Tolivia, J. (2003). Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J Histochem Cytochem* 51, 1285-1290.
- Desai, P. P., Ikonovic, M. D., Abrahamson, E. E., Hamilton, R. L., Isanski, B. A., Hope, C. E., Klunk, W. E., DeKosky, S. T., and Kamboh, M. I. (2005). Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiol Dis* 20, 574-582.
- Diez-Itza, I., Vizoso, F., Merino, A. M., Sanchez, L. M., Tolivia, J., Fernandez, J., Ruibal, A., and Lopez-Otin, C. (1994). Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am J Pathol* 144, 310-320.
- Dilley, W. G., Haagensen, D. E., Cox, C. E., and Wells, S. A., Jr. (1990). Immunologic and steroid binding properties of the GCDP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid. *Breast Cancer Res Treat* 16, 253-260.

- Dimri, G. P., Testori, A., Acosta, M., and Campisi, J. (1996). Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biological signals* 5, 154-162.
- Do Carmo, S., Jacomy, H., Talbot, P. J., and Rassart, E. (2008). Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 10330-10338.
- Do Carmo, S., Levros, L. C., Jr., and Rassart, E. (2007). Modulation of apolipoprotein D expression and translocation under specific stress conditions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 954-969.
- Do Carmo, S., Seguin, D., Milne, R., and Rassart, E. (2002). Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem* 277, 5514-5523.
- Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., and et al. (1986). Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem* 261, 16535-16539.
- Drayna, D., Scott, J. D., and Lawn, R. (1987a). Multiple RFLPs at the human apolipoprotein D (APOD) locus. *Nucleic Acids Res* 15, 9617.
- Drayna, D. T., McLean, J. W., Wion, K. L., Trent, J. M., Drabkin, H. A., and Lawn, R. M. (1987b). Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily. *DNA* 6, 199-204.
- Drewett, V., Devitt, A., Saxton, J., Portman, N., Greaney, P., Cheong, N. E., Alnemri, T. F., Alnemri, E., and Shaw, P. E. (2001). Serum response factor cleavage by caspases 3 and 7 linked to apoptosis in human BJAB cells. *J Biol Chem* 276, 33444-33451.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S., and Burd, C. G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62, 289-321.
- Edmunds, J. W., and Mahadevan, L. C. (2006). Cell signaling. Protein kinases seek close encounters with active genes. *Science* 313, 449-451.

- Eichinger, A., Nasreen, A., Kim, H. J., and Skerra, A. (2007). Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem* 282, 31068-31075.
- Elliott, D. A., Weickert, C. S., and Garner, B. (2010). Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin Lipidol* 51, 555-573.
- Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I., and Taya, Y. (2006). Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes Dev* 20, 1087-1099.
- Escribano, J., Ortego, J., and Coca-Prados, M. (1995). Isolation and characterization of cell-specific cDNA clones from a subtractive library of the ocular ciliary body of a single normal human donor: transcription and synthesis of plasma proteins. *J Biochem* 118, 921-931.
- Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., and Farooqui, T. (2007). Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* 101, 577-599.
- Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (1980). A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3327-3330.
- Fisher, R. J., Mavrothalassitis, G., Kondoh, A., and Papas, T. S. (1991). High-affinity DNA-protein interactions of the cellular ETS1 protein: the determination of the ETS binding motif. *Oncogene* 6, 2249-2254.
- Flower, D. R. (1994). The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett* 354, 7-11.
- Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318 (Pt 1), 1-14.
- Franz, G., Reindl, M., Patel, S. C., Beer, R., Unterrichter, I., Berger, T., Schmutzhard, E., Poewe, W., and Kampfl, A. (1999). Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 73, 1615-1625.
- Frenette Charron, J. B., Breton, G., Badawi, M., and Sarhan, F. (2002). Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 517, 129-132.

- Fritz, G. (2000). Human APE/Ref-1 protein. *The international journal of biochemistry & cell biology* 32, 925-929.
- Fritz, G., Grosch, S., Tomacic, M., and Kaina, B. (2003). APE/Ref-1 and the mammalian response to genotoxic stress. *Toxicology* 193, 67-78.
- Ganfornina, M. D., Do Carmo, S., Lora, J. M., Torres-Schumann, S., Vogel, M., Allhorn, M., Gonzalez, C., Bastiani, M. J., Rassart, E., and Sanchez, D. (2008). Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* 7, 506-515.
- Ganfornina, M. D., Do Carmo, S., Martinez, E., Tolivia, J., Navarro, A., Rassart, E., and Sanchez, D. (2010). ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia* 58, 1320-1334.
- Ganfornina, M. D., Sanchez, D., Pagano, A., Tonachini, L., Descalzi-Cancedda, F., and Martinez, S. (2005). Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins. *Dev Dyn* 232, 191-199.
- Gao, C., Guo, H., Mi, Z., Wai, P. Y., and Kuo, P. C. (2005). Transcriptional regulatory functions of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-U and -A/B in endotoxin-mediated macrophage expression of osteopontin. *J Immunol* 175, 523-530.
- Geldmacher, D. S., Fritsch, T., McClendon, M. J., and Landreth, G. (2011). A randomized pilot clinical trial of the safety of pioglitazone in treatment of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68, 45-50.
- Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M. H., and Shaw, P. E. (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 14, 951-962.
- Gilmour, R. S., Spandidos, D. A., Vass, J. K., Gow, J. W., and Paul, J. (1984). A negative regulatory sequence near the mouse beta-maj globin gene associated with a region of potential Z-DNA. *EMBO J* 3, 1263-1272.

- Glockner, F., and Ohm, T. G. (2003). Hippocampal apolipoprotein D level depends on Braak stage and APOE genotype. *Neuroscience* 122, 103-110.
- Goessling, W., and Zucker, S. D. (2000). Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G356-365.
- Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-1133.
- Griffin, R. J., Curtin, N. J., Newell, D. R., Golding, B. T., Durkacz, B. W., and Calvert, A. H. (1995). The role of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase as resistance-modifying agents in cancer therapy. *Biochimie* 77, 408-422.
- Hahn, S. L., and Wasylyk, B. (1994). The oncoprotein v-Ets is less selective in DNA binding than c-Ets-1 due to the C-terminal sequence change. *Oncogene* 9, 2499-2512.
- Hamada, H., Seidman, M., Howard, B. H., and Gorman, C. M. (1984). Enhanced gene expression by the poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequence. *Mol Cell Biol* 4, 2622-2630.
- Han, G. A., Malintan, N. T., Collins, B. M., Meunier, F. A., and Sugita, S. (2010). Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion. *J Neurochem* 115, 1-10.
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774-785.
- He, Y., Brown, M. A., Rothnagel, J. A., Saunders, N. A., and Smith, R. (2005). Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *J Cell Sci* 118, 3173-3183.
- Heintz, N. (2004). Gene expression nervous system atlas (GENSAT). *Nat Neurosci* 7, 483.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature reviews Neuroscience* 6, 201-214.
- Hock, A., and Vousden, K. H. (2010). Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1618-1621.

- Hollingworth, P., Harold, D., Jones, L., Owen, M. J., and Williams, J. (2011). Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. *Int J Geriatr Psychiatry* 26, 793-802.
- Holzfeind, P., Merschak, P., Dieplinger, H., and Redl, B. (1995). The human lacrimal gland synthesizes apolipoprotein D mRNA in addition to tear prealbumin mRNA, both species encoding members of the lipocalin superfamily. *Exp Eye Res* 61, 495-500.
- Hu, C. Y., Ong, W. Y., Sundaram, R. K., Chan, C., and Patel, S. C. (2001). Immunocytochemical localization of apolipoprotein D in oligodendrocyte precursor-like cells, perivascular cells, and pericytes in the human cerebral cortex. *J Neurocytol* 30, 209-218.
- Hunter, S., Young, A., Olson, J., Brat, D. J., Bowers, G., Wilcox, J. N., Jaye, D., Mendrinos, S., and Neish, A. (2002). Differential expression between pilocytic and anaplastic astrocytomas: identification of apolipoprotein D as a marker for low-grade, non-infiltrating primary CNS neoplasms. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 275-281.
- Hunter, S. B., and Moreno, C. S. (2002). Expression microarray analysis of brain tumors: what have we learned so far. *Front Biosci* 7, c74-82.
- Inoue, A., Omori, A., Ichinose, S., Takahashi, K. P., Kinoshita, Y., and Mita, S. (2001). S1 proteins C2 and D2 are novel hnRNPs similar to the transcriptional repressor, CARG box motif-binding factor A. *Eur J Biochem* 268, 3654-3663.
- Izumi, T., Henner, W. D., and Mitra, S. (1996). Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein. *Biochemistry* 35, 14679-14683.
- Jackson, E. B., Theriot, C. A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., and Izumi, T. (2005). Analysis of nuclear transport signals in the human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1/Ref1). *Nucleic acids research* 33, 3303-3312.
- Jacomy, H., Fragoso, G., Almazan, G., Mushynski, W. E., and Talbot, P. J. (2006). Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. *Virology* 349, 335-346.

- Jacomy, H., and Talbot, P. J. (2003). Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* 315, 20-33.
- Jansen, P. J., Lutjohann, D., Thelen, K. M., von Bergmann, K., van Leuven, F., Ramaekers, F. C., and Monique, M. (2009). Absence of ApoE upregulates murine brain ApoD and ABCA1 levels, but does not affect brain sterol levels, while human ApoE3 and human ApoE4 upregulate brain cholesterol precursor levels. *J Alzheimers Dis* 18, 319-329.
- Jimenez, J. S. (2010). Protein-DNA interaction at the origin of neurological diseases: a hypothesis. *J Alzheimers Dis* 22, 375-391.
- Johnson-Wood, K., Lee, M., Motter, R., Hu, K., Gordon, G., Barbour, R., Khan, K., Gordon, M., Tan, H., Games, D., *et al.* (1997). Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1550-1555.
- Johnston, C., Jiang, W., Chu, T., and Levine, B. (2001). Identification of genes involved in the host response to neurovirulent alphavirus infection. *J Virol* 75, 10431-10445.
- Kajita, Y., Nakayama, J., Aizawa, M., and Ishikawa, F. (1995). The UUAG-specific RNA binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0. Common modular structure and binding properties of the 2xRBD-Gly family. *J Biol Chem* 270, 22167-22175.
- Kalman, J., McConathy, W., Araoz, C., Kasa, P., and Lacko, A. G. (2000). Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol Res* 22, 330-336.
- Kamada, S., and Miwa, T. (1992). A protein binding to CArG box motifs and to single-stranded DNA functions as a transcriptional repressor. *Gene* 119, 229-236.
- Kaneoka, H., Miyake, K., and Iijima, S. (2009). Interactions between the nuclear matrix and an enhancer of the tryptophan oxygenase gene. *Biochemical and biophysical research communications* 387, 717-722.

- Kang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., Zhang, M., Bao, G., Wang, F., Zhang, X., *et al.* (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123, 833-847.
- Kang, M. K., Kameta, A., Shin, K. H., Baluda, M. A., Kim, H. R., and Park, N. H. (2003a). Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res* 287, 272-281.
- Kang, S., Seo, S., Hill, J., Kwon, B., Lee, H., Cho, H., Vinay, D., and Kwon, B. (2003b). Changes in gene expression in latent HSV-1-infected rabbit trigeminal ganglia following epinephrine iontophoresis. *Curr Eye Res* 26, 225-229.
- Kantidakis, T., Ramsbottom, B. A., Birch, J. L., Dowding, S. N., and White, R. J. (2010). mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11823-11828.
- Kato, J. Y., and Yoneda-Kato, N. (2009). Mammalian COP9 signalosome. *Genes Cells* 14, 1209-1225.
- Khan, M. M., Parikh, V. V., and Mahadik, S. P. (2003). Antipsychotic drugs differentially modulate apolipoprotein D in rat brain. *Journal of neurochemistry* 86, 1089-1100.
- Kim, H. J., Je, H. J., Cheon, H. M., Kong, S. Y., Han, J., Yun, C. Y., Han, Y. S., Lee, I. H., Kang, Y. J., and Seo, S. J. (2005). Accumulation of 23 kDa lipocalin during brain development and injury in *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 1133-1141.
- Kim, J. H., Yang, C. K., Heo, K., Roeder, R. G., An, W., and Stallcup, M. R. (2008a). CCAR1, a key regulator of mediator complex recruitment to nuclear receptor transcription complexes. *Molecular cell* 31, 510-519.
- Kim, W. S., Elliott, D. A., Kockx, M., Kritharides, L., Rye, K. A., Jans, D. A., and Garner, B. (2008b). Analysis of apolipoprotein E nuclear localization using green fluorescent protein and biotinylation approaches. *Biochem J* 409, 701-709.

- Kim, W. S., Wong, J., Weickert, C. S., Webster, M. J., Bahn, S., and Garner, B. (2009). Apolipoprotein-D expression is increased during development and maturation of the human prefrontal cortex. *J Neurochem* 109, 1053-1066.
- Kinyamu, H. K., and Archer, T. K. (2007). Proteasome activity modulates chromatin modifications and RNA polymerase II phosphorylation to enhance glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 27, 4891-4904.
- Kraus, W. L. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current opinion in cell biology* 20, 294-302.
- Labonte, P., Mounir, S., and Talbot, P. J. (1995). Sequence and expression of the ns2 protein gene of human coronavirus OC43. *J Gen Virol* 76 (Pt 2), 431-435.
- Lahiri, D. K., and Ge, Y. (2000). Electrophoretic mobility shift assay for the detection of specific DNA-protein complex in nuclear extracts from the cultured cells and frozen autopsy human brain tissue. *Brain research Brain research protocols* 5, 257-265.
- Lambert, J., Provost, P. R., Marcel, Y. L., and Rassart, E. (1993). Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim Biophys Acta* 1172, 190-192.
- Lambert, J. C., and Amouyel, P. (2011). Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* 21, 295-301.
- Lanthier, J., and Desrosiers, R. R. (2004). Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration. *Experimental cell research* 293, 96-105.
- Latinkic, B. V., Zeremski, M., and Lau, L. F. (1996). Elk-1 can recruit SRF to form a ternary complex upon the serum response element. *Nucleic Acids Res* 24, 1345-1351.
- Lea, O. A. (1988). Binding properties of progesterone-binding Cyst protein, PBCP. *Steroids* 52, 337-338.
- Leduc, V., Domenger, D., De Beaumont, L., Lalonde, D., Belanger-Jasmin, S., and Poirier, J. (2011). Function and comorbidities of apolipoprotein e in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 974361.

- Leduc, V., Jasmin-Belanger, S., and Poirier, J. (2010). APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 16, 469-477.
- Lee, E. B., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2012). Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13, 38-50.
- Lee, T. H., Pastorino, L., and Lu, K. P. (2011). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med* 13, e21.
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., *et al.* (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176.
- Levros, L. C., Jr., Do Carmo, S., Edouard, E., Legault, P., Charfi, C., and Rassart, E. (2010). Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochim Biophys Acta* 1803, 1062-1071.
- Li, J., Calkins, M. J., Johnson, D. A., and Johnson, J. A. (2007). Role of Nrf2-dependent ARE-driven antioxidant pathway in neuroprotection. *Methods Mol Biol* 399, 67-78.
- Lin, B., Pan, C. J., and Chou, J. Y. (2000). Human variant glucose-6-phosphate transporter is active in microsomal transport. *Human genetics* 107, 526-529.
- Liou, Y. C., Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2011). Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* 36, 501-514.
- Liu, C. J., Chang, E., Yu, J., Carlson, C. S., Prazak, L., Yu, X. P., Ding, B., Lengyel, P., and Di Cesare, P. E. (2005). The interferon-inducible p204 protein acts as a transcriptional coactivator of Cbfa1 and enhances osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* 280, 2788-2796.
- Liu, Z., Chang, G. Q., and Leibowitz, S. F. (2001). Apolipoprotein D interacts with the long-form leptin receptor: a hypothalamic function in the control of energy homeostasis. *FASEB J* 15, 1329-1331.

- Loerch, P. M., Lu, T., Dakin, K. A., Vann, J. M., Isaacs, A., Geula, C., Wang, J., Pan, Y., Gabuzda, D. H., Li, C., *et al.* (2008). Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PloS one* 3, e3329.
- Lonskaya, I., Potaman, V. N., Shlyakhtenko, L. S., Oussatcheva, E. A., Lyubchenko, Y. L., and Soldatenkov, V. A. (2005). Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *The Journal of biological chemistry* 280, 17076-17083.
- Lopez-Boado, Y. S., Klaus, M., Dawson, M. I., and Lopez-Otin, C. (1996). Retinoic acid-induced expression of apolipoprotein D and concomitant growth arrest in human breast cancer cells are mediated through a retinoic acid receptor RARalpha-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 271, 32105-32111.
- Lopez-Boado, Y. S., Puente, X. S., Alvarez, S., Tolivia, J., Binderup, L., and Lopez-Otin, C. (1997). Growth inhibition of human breast cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is accompanied by induction of apolipoprotein D expression. *Cancer Res* 57, 4091-4097.
- Lopez-Boado, Y. S., Tolivia, J., and Lopez-Otin, C. (1994). Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269, 26871-26878.
- Lord-Dufour, S., Copland, I. B., Levros, L. C., Jr., Post, M., Das, A., Khosla, C., Galipeau, J., Rassart, E., and Annabi, B. (2009). Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1alpha: Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 27, 489-497.
- Lou, H., Du, S., Ji, Q., and Stolz, A. (2006). Induction of AKR1C2 by phase II inducers: identification of a distal consensus antioxidant response element regulated by NRF2. *Molecular pharmacology* 69, 1662-1672.
- Lynch, M. D. (2006). How does cellular senescence prevent cancer? *DNA and cell biology* 25, 69-78.

- Mahadik, S. P., Khan, M. M., Evans, D. R., and Parikh, V. V. (2002). Elevated plasma level of apolipoprotein D in schizophrenia and its treatment and outcome. *Schizophrenia research* 58, 55-62.
- Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630.
- Mandrekar-Colucci, S., and Landreth, G. E. (2011). Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* 15, 1085-1097.
- Martinez, E., Navarro, A., Ordonez, C., Del Valle, E., and Tolivia, J. (2012). Amyloid-beta25-35 Induces Apolipoprotein D Synthesis and Growth Arrest in HT22 Hippocampal Cells. *J Alzheimers Dis*.
- Masliah, E., Sisk, A., Mallory, M., Mucke, L., Schenk, D., and Games, D. (1996). Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16, 5795-5811.
- May, P. C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S. A., Poirier, J., Masters, J. N., and Finch, C. E. (1990). Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron* 5, 831-839.
- McConathy, W. J., and Alaupovic, P. (1973). Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett* 37, 178-182.
- McConathy, W. J., and Alaupovic, P. (1976). Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry* 15, 515-520.
- McCormick, A., and Campisi, J. (1991). Cellular aging and senescence. *Current opinion in cell biology* 3, 230-234.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., *et al.* (2007). Roles of the

- Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1263-1284.
- McIntosh, K., Becker, W. B., and Chanock, R. M. (1967a). Growth in suckling-mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 2268-2273.
- McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., and Chanock, R. M. (1967b). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 933-940.
- Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.
- Menon, S. G., and Goswami, P. C. (2007). A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 26, 1101-1109.
- Miaczynska, M., Christoforidis, S., Giner, A., Shevchenko, A., Uttenweiler-Joseph, S., Habermann, B., Wilm, M., Parton, R. G., and Zerial, M. (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 116, 445-456.
- Miano, J. M. (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 35, 577-593.
- Middleditch, C., Clottes, E., and Burchell, A. (1998). A different isoform of the transport protein mutated in the glycogen storage disease 1b is expressed in brain. *FEBS Lett* 433, 33-36.
- Midorikawa, R., Takei, Y., and Hirokawa, N. (2006). KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell* 125, 371-383.
- Mikheev, A. M., Mikheev, S. A., Zhang, Y., Aebersold, R., and Zarbl, H. (2000). CArG binding factor A (CBF-A) is involved in transcriptional regulation of the rat Ha-ras promoter. *Nucleic acids research* 28, 3762-3770.

- Mikula, M., and Bomsztyk, K. (2011). Direct recruitment of ERK cascade components to inducible genes is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K. *J Biol Chem* 286, 9763-9775.
- Mills, I. G., Gaughan, L., Robson, C., Ross, T., McCracken, S., Kelly, J., and Neal, D. E. (2005). Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors. *J Cell Biol* 170, 191-200.
- Miloso, M., Scuteri, A., Foudah, D., and Tredici, G. (2008). MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem* 15, 538-548.
- Moh, C., Kubiak, J. Z., Bajic, V. P., Zhu, X., Smith, M. A., and Lee, H. G. (2011). Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease. *Results Probl Cell Differ* 53, 565-576.
- Montpied, P., de Bock, F., Lerner-Natoli, M., Bockaert, J., and Rondouin, G. (1999). Hippocampal alterations of apolipoprotein E and D mRNA levels in vivo and in vitro following kainate excitotoxicity. *Epilepsy Res* 35, 135-146.
- Morais Cabral, J. H., Atkins, G. L., Sanchez, L. M., Lopez-Boado, Y. S., Lopez-Otin, C., and Sawyer, L. (1995). Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett* 366, 53-56.
- Motoshima, H., Goldstein, B. J., Igata, M., and Araki, E. (2006). AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *The Journal of physiology* 574, 63-71.
- Mounir, S., Labonte, P., and Talbot, P. J. (1993). Characterization of the nonstructural and spike proteins of the human respiratory coronavirus OC43: comparison with bovine enteric coronavirus. *Adv Exp Med Biol* 342, 61-67.
- Muffat, J., Walker, D. W., and Benzer, S. (2008). Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7088-7093.

- Murray, R. S., Brown, B., Brian, D., and Cabirac, G. F. (1992). Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Annals of neurology* 31, 525-533.
- Myint, S., Johnston, S., Sanderson, G., and Simpson, H. (1994). Evaluation of nested polymerase chain methods for the detection of human coronaviruses 229E and OC43. *Mol Cell Probes* 8, 357-364.
- Navarro, A., Del Valle, E., Astudillo, A., Gonzalez del Rey, C., and Tolivia, J. (2003). Immunohistochemical study of distribution of apolipoproteins E and D in human cerebral beta amyloid deposits. *Exp Neurol* 184, 697-704.
- Navarro, A., del Valle, E., Juarez, A., Martinez, E., Ordonez, C., Astudillo, A., and Tolivia, J. (2010). Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *Age (Dordr)* 32, 85-96.
- Navarro, A., Del Valle, E., and Tolivia, J. (2004). Differential expression of apolipoprotein d in human astroglial and oligodendroglial cells. *J Histochem Cytochem* 52, 1031-1036.
- Navarro, A., Ordonez, C., Martinez, E., Perez, C., Astudillo, A., and Tolivia, J. (2008). Apolipoprotein D expression absence in degenerating neurons of human central nervous system. *Histol Histopathol* 23, 995-1001.
- Navarro, A., Tolivia, J., Astudillo, A., and del Valle, E. (1998). Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neurosci Lett* 254, 17-20.
- Nelson, J. D., LeBoeuf, R. C., and Bomsztyk, K. (2011). Direct recruitment of insulin receptor and ERK signaling cascade to insulin-inducible gene loci. *Diabetes* 60, 127-137.
- Nilsson, O. S., Arion, W. J., Depierre, J. W., Dallner, G., and Ernster, L. (1978). Evidence for the involvement of a glucose-6-phosphate carrier in microsomal glucose-6-phosphatase activity. *European journal of biochemistry / FEBS* 82, 627-634.
- Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A., and Salminen, A. (2009). Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 61, 89-104.

- Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D., and Graves, B. J. (1992). Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes & development* 6, 975-990.
- O'Brien, J. S., and Sampson, E. L. (1965). Myelin Membrane: a molecular abnormality. *Science* 150, 1613-1614.
- Ogawa, K., Utsunomiya, T., Mimori, K., Yamashita, K., Okamoto, M., Tanaka, F., Inoue, H., Ikeda, Y., Saku, M., Murayama, S., and Mori, M. (2005). Genomic screens for genes upregulated by demethylation in colorectal cancer: possible usefulness for clinical application. *Int J Oncol* 27, 417-426.
- Okada, H., Inoue, T., Kikuta, T., Kato, N., Kanno, Y., Hirosawa, N., Sakamoto, Y., Sugaya, T., and Suzuki, H. (2008). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 enhances transcription of the profibrotic CCN2 gene. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19, 933-942.
- Ong, W. Y., He, Y., Suresh, S., and Patel, S. C. (1997). Differential expression of apolipoprotein D and apolipoprotein E in the kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 79, 359-367.
- Ong, W. Y., Lau, C. P., Leong, S. K., Kumar, U., Suresh, S., and Patel, S. C. (1999). Apolipoprotein D gene expression in the rat brain and light and electron microscopic immunocytochemistry of apolipoprotein D expression in the cerebellum of neonatal, immature and adult rats. *Neuroscience* 90, 913-922.
- Ordenez, C., Navarro, A., Perez, C., Astudillo, A., Martinez, E., and Tolivia, J. (2006). Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol Histopathol* 21, 361-366.
- Ou, C. Y., Kim, J. H., Yang, C. K., and Stallcup, M. R. (2009). Requirement of cell cycle and apoptosis regulator 1 for target gene activation by Wnt and beta-catenin and for anchorage-independent growth of human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 284, 20629-20637.

- Paintlia, A. S., Paintlia, M. K., Singh, I., and Singh, A. K. (2006). Immunomodulatory effect of combination therapy with lovastatin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside alleviates neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology* 169, 1012-1025.
- Pan, C. J., Lei, K. J., Annabi, B., Hemrika, W., and Chou, J. Y. (1998). Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 273, 6144-6148.
- Panin, L. E., Polyakov, L. M., Kolosova, N. G., Russkikh, G. S., and Poteryaeva, O. N. (1998). Distribution of tocopherol and apolipoprotein A-I immunoreactivity in rat liver chromatin. *Membr Cell Biol* 11, 631-640.
- Panin, L. E., Russkikh, G. S., and Polyakov, L. M. (2000). Detection of apolipoprotein A-I, B, and E immunoreactivity in the nuclei of various rat tissue cells. *Biochemistry (Mosc)* 65, 1419-1423.
- Pant, S., Sharma, M., Patel, K., Caplan, S., Carr, C. M., and Grant, B. D. (2009). AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol* 11, 1399-1410.
- Parrinello, S., Coppe, J. P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 118, 485-496.
- Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763.
- Patel, R. C., Lange, D., McConathy, W. J., Patel, Y. C., and Patel, S. C. (1997). Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy. *Protein Eng* 10, 621-625.

- Patel, S. C., Asotra, K., Patel, Y. C., McConathy, W. J., Patel, R. C., and Suresh, S. (1995). Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuroreport* 6, 653-657.
- Patel, S. C., and Pentchev, P. G. (1989). Genetic defects of lysosomal function in animals. *Annu Rev Nutr* 9, 395-416.
- Patry, C., Bouchard, L., Labrecque, P., Gendron, D., Lemieux, B., Toutant, J., Lapointe, E., Wellinger, R., and Chabot, B. (2003). Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer Res* 63, 7679-7688.
- Pazolli, E., and Stewart, S. A. (2008). Senescence: the good the bad and the dysfunctional. *Current opinion in genetics & development* 18, 42-47.
- Pearlman, W. H., Gueriguan, J. L., and Sawyer, M. E. (1973). A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid. *J Biol Chem* 248, 5736-5741.
- Peitsch, M. C., and Boguski, M. S. (1990). Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol* 2, 197-206.
- Penberthy, W. T., and Tsunoda, I. (2009). The importance of NAD in multiple sclerosis. *Curr Pharm Des* 15, 64-99.
- Perdomo, G., and Henry Dong, H. (2009). Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging (Albany NY)* 1, 17-27.
- Pfriege, F. W., and Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res* 50, 357-371.
- Pilecka, I., Banach-Orlowska, M., and Miaczynska, M. (2007). Nuclear functions of endocytic proteins. *Eur J Cell Biol* 86, 533-547.
- Poirier, J. (2005). Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 26, 355-361.
- Pokholok, D. K., Zeitlinger, J., Hannett, N. M., Reynolds, D. B., and Young, R. A. (2006). Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* 313, 533-536.

- Prasad, R., Giri, S., Nath, N., Singh, I., and Singh, A. K. (2006). 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of endothelial-monocyte interaction. *Journal of neuroscience research* 84, 614-625.
- Prosniak, M., Hooper, D. C., Dietzschold, B., and Koprowski, H. (2001). Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2758-2763.
- Provost, P. R., Marcel, Y. L., Milne, R. W., Weech, P. K., and Rassart, E. (1991a). Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett* 290, 139-141.
- Provost, P. R., Villeneuve, L., Weech, P. K., Milne, R. W., Marcel, Y. L., and Rassart, E. (1991b). Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J Lipid Res* 32, 1959-1970.
- Provost, P. R., Weech, P. K., Tremblay, N. M., Marcel, Y. L., and Rassart, E. (1990). Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J Lipid Res* 31, 2057-2065.
- Pyrzynska, B., Pilecka, I., and Miaczynska, M. (2009). Endocytic proteins in the regulation of nuclear signaling, transcription and tumorigenesis. *Mol Oncol* 3, 321-338.
- Quinn, C. M., Kagedal, K., Terman, A., Stroikin, U., Brunk, U. T., Jessup, W., and Garner, B. (2004). Induction of fibroblast apolipoprotein E expression during apoptosis, starvation-induced growth arrest and mitosis. *Biochem J* 378, 753-761.
- Rall, S. C., Jr., Weisgraber, K. H., and Mahley, R. W. (1982). Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 257, 4171-4178.
- Ramirez, S., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1997). The CREB-binding protein (CBP) cooperates with the serum response factor for transactivation of the c-fos serum response element. *J Biol Chem* 272, 31016-31021.

- Rashid, S., Pilecka, I., Torun, A., Olchowik, M., Bielinska, B., and Miaczynska, M. (2009). Endosomal adaptor proteins APPL1 and APPL2 are novel activators of beta-catenin/TCF-mediated transcription. *J Biol Chem* 284, 18115-18128.
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L., and Milne, R. (2000). Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* 1482, 185-198.
- Rech, J., Barlat, I., Veyrune, J. L., Vie, A., and Blanchard, J. M. (1994). Nuclear import of serum response factor (SRF) requires a short amino-terminal nuclear localization sequence and is independent of the casein kinase II phosphorylation site. *Journal of cell science* 107 (Pt 11), 3029-3036.
- Reindl, M., Knipping, G., Wicher, I., Dilitz, E., Egg, R., Deisenhammer, F., and Berger, T. (2001). Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 119, 327-332.
- Riddell, D. R., Zhou, H., Atchison, K., Warwick, H. K., Atkinson, P. J., Jefferson, J., Xu, L., Aschmies, S., Kirksey, Y., Hu, Y., *et al.* (2008). Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels. *J Neurosci* 28, 11445-11453.
- Rishi, A. K., Zhang, L., Boyanapalli, M., Wali, A., Mohammad, R. M., Yu, Y., Fontana, J. A., Hatfield, J. S., Dawson, M. I., Majumdar, A. P., and Reichert, U. (2003). Identification and characterization of a cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 as a novel mediator of apoptosis signaling by retinoid CD437. *The Journal of biological chemistry* 278, 33422-33435.
- Rishi, A. K., Zhang, L., Yu, Y., Jiang, Y., Nautiyal, J., Wali, A., Fontana, J. A., Levi, E., and Majumdar, A. P. (2006). Cell cycle- and apoptosis-regulatory protein-1 is involved in apoptosis signaling by epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 281, 13188-13198.
- Roger, B., Moisand, A., Amalric, F., and Bouvet, P. (2002). Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* 277, 10209-10219.

- Saha, S., and Rangarajan, P. N. (2003). Common host genes are activated in mouse brain by Japanese encephalitis and rabies viruses. *J Gen Virol* 84, 1729-1735.
- Salier, J. P. (2000). Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes. *Biochim Biophys Acta* 1482, 25-34.
- Salmi, A., Ziola, B., Hovi, T., and Reunanen, M. (1982). Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 32, 292-295.
- Sanchez, D., Lopez-Arias, B., Torroja, L., Canal, I., Wang, X., Bastiani, M. J., and Ganfornina, M. D. (2006). Loss of glial lazaro, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol* 16, 680-686.
- Sanchez, L. M., Vizoso, F., Diez-Itza, I., and Lopez-Otin, C. (1992). Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. *Cancer Res* 52, 95-100.
- Sarjeant, J. M., Lawrie, A., Kinnear, C., Yablonsky, S., Leung, W., Massaeli, H., Prichett, W., Veinot, J. P., Rassart, E., and Rabinovitch, M. (2003). Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2172-2177.
- Sarsour, E. H., Kumar, M. G., Chaudhuri, L., Kalen, A. L., and Goswami, P. C. (2009). Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 11, 2985-3011.
- Sastry, S. S., and Kun, E. (1990). The interaction of adenosine diphosphoribosyl transferase (ADPRT) with a cruciform DNA. *Biochemical and biophysical research communications* 167, 842-847.
- Sato, T., Hanyu, H., Hirao, K., Kanetaka, H., Sakurai, H., and Iwamoto, T. (2011). Efficacy of PPAR-gamma agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. *Neurobiology of aging* 32, 1626-1633.
- Saxena, A., Saffery, R., Wong, L. H., Kalitsis, P., and Choo, K. H. (2002). Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1

- protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *The Journal of biological chemistry* 277, 26921-26926.
- Schaeren-Wiemers, N., Schaefer, C., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., and Schwab, M. E. (1995). Identification of new oligodendrocyte- and myelin-specific genes by a differential screening approach. *J Neurochem* 65, 10-22.
- Schindler, P. A., Settineri, C. A., Collet, X., Fielding, C. J., and Burlingame, A. L. (1995). Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein Sci* 4, 791-803.
- Seguin, D., Desforges, M., and Rassart, E. (1995). Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res Mol Brain Res* 30, 242-250.
- Semenkovich, C. F., Ostlund, R. E., Jr., Olson, M. O., and Yang, J. W. (1990). A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry* 29, 9708-9713.
- Setsuie, R., and Wada, K. (2007). The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 51, 105-111.
- Sharma, V. M., Shareef, M. M., Bhaskar, K., Kalidas, S., Shetty, P. A., Christopher, R., Ramamohan, Y., Pant, H. C., and Shetty, T. K. (2005). Nuclear localization of Munc18-1 (p67) in the adult rat brain and PC12 cells. *Neurochem Int* 47, 225-234.
- Sharrocks, A. D. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 827-837.
- Shibata, Y., Muramatsu, T., Hirai, M., Inui, T., Kimura, T., Saito, H., McCormick, L. M., Bu, G., and Kadomatsu, K. (2002). Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol* 22, 6788-6796.

- Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H., and Shirasawa, T. (2000). Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Archives of biochemistry and biophysics* 381, 225-234.
- Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., and Yu, K. (2010). Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *J Biol Chem* 285, 15380-15392.
- Shore, V. G., and Shore, B. (1973). Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12, 502-507.
- Simard, J., Dauvois, S., Haagenzen, D. E., Levesque, C., Merand, Y., and Labrie, F. (1990). Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer. *Endocrinology* 126, 3223-3231.
- Simard, J., de Launoit, Y., Haagenzen, D. E., and Labrie, F. (1992). Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein-D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology* 130, 1115-1121.
- Simard, J., Veilleux, R., de Launoit, Y., Haagenzen, D. E., and Labrie, F. (1991). Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 51, 4336-4341.
- Simone, C., Forcales, S. V., Hill, D. A., Imbalzano, A. N., Latella, L., and Puri, P. L. (2004). p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat Genet* 36, 738-743.
- Smith, K. M., Lawn, R. M., and Wilcox, J. N. (1990). Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J Lipid Res* 31, 995-1004.

- Soiland, H., Soreide, K., Janssen, E. A., Korner, H., Baak, J. P., and Soreide, J. A. (2007). Emerging concepts of apolipoprotein D with possible implications for breast cancer. *Cell Oncol* 29, 195-209.
- Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Olek, K., and Muller, H. W. (1990). Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J* 9, 2479-2484.
- Stewart, J. N., Mounir, S., and Talbot, P. J. (1992). Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* 191, 502-505.
- Steyrer, E., and Kostner, G. M. (1988). Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. *Biochim Biophys Acta* 958, 484-491.
- Subramaniam, S., and Unsicker, K. (2006). Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience* 138, 1055-1065.
- Subramaniam, S., and Unsicker, K. (2010). ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J* 277, 22-29.
- Suresh, S., Yan, Z., Patel, R. C., Patel, Y. C., and Patel, S. C. (1998). Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem* 70, 242-251.
- Szutorisz, H., Georgiou, A., Tora, L., and Dillon, N. (2006). The proteasome restricts permissive transcription at tissue-specific gene loci in embryonic stem cells. *Cell* 127, 1375-1388.
- Talbot, P. J., Arnold, D., and Antel, J. P. (2001). Virus-induced autoimmune reactions in the CNS. *Curr Top Microbiol Immunol* 253, 247-271.
- Tapia-Paez, I., Tammimies, K., Massinen, S., Roy, A. L., and Kere, J. (2008). The complex of TFII-I, PARP1, and SFPQ proteins regulates the DYX1C1 gene implicated in neuronal migration and dyslexia. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 3001-3009.

- Tell, G., Quadrifoglio, F., Tiribelli, C., and Kelley, M. R. (2009). The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxidants & redox signaling* 11, 601-620.
- Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., Milne, R., and Rassart, E. (1998). Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem* 71, 1643-1650.
- Terrisse, L., Seguin, D., Bertrand, P., Poirier, J., Milne, R., and Rassart, E. (1999). Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Brain Res Mol Brain Res* 70, 26-35.
- Thomas, E. A., Dean, B., Pavey, G., and Sutcliffe, J. G. (2001). Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4066-4071.
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46, 567-574.
- Treisman, R. (1990). The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Seminars in cancer biology* 1, 47-58.
- Treisman, R., Marais, R., and Wynne, J. (1992). Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. *The EMBO journal* 11, 4631-4640.
- Utsunomiya, T., Ogawa, K., Yoshinaga, K., Ohta, M., Yamashita, K., Mimori, K., Inoue, H., Ezaki, T., Yoshikawa, Y., and Mori, M. (2005). Clinicopathologic and prognostic values of apolipoprotein D alterations in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 116, 105-109.
- Vabret, A., Mourez, T., Gouarin, S., Petitjean, J., and Freymuth, F. (2003). An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. *Clin Infect Dis* 36, 985-989.
- Van Gassen, G., and Annaert, W. (2003). Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 9, 117-126.

- van Muiswinkel, F. L., and Kuiperij, H. B. (2005). The Nrf2-ARE Signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4, 267-281.
- Vantaggiato, C., Formentini, I., Bondanza, A., Bonini, C., Naldini, L., and Brambilla, R. (2006). ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *Journal of biology* 5, 14.
- Verger, A., and Duterque-Coquillaud, M. (2002). When Ets transcription factors meet their partners. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24, 362-370.
- Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., *et al.* (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.
- Vezina, C. A., Milne, R. W., Weech, P. K., and Marcel, Y. L. (1988). Apolipoprotein distribution in human lipoproteins separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *J Lipid Res* 29, 573-585.
- Vicent, G. P., Ballare, C., Nacht, A. S., Clausell, J., Subtil-Rodriguez, A., Quiles, I., Jordan, A., and Beato, M. (2006). Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3. *Mol Cell* 24, 367-381.
- Vissers, J. H., Nicassio, F., van Lohuizen, M., Di Fiore, P. P., and Citterio, E. (2008). The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from the DUBs. *Cell Div* 3, 8.
- Vogt, M., and Skerra, A. (2001). Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J Mol Recognit* 14, 79-86.
- Walker, D. W., Muffat, J., Rundel, C., and Benzer, S. (2006). Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr Biol* 16, 674-679.

- Wang, L., Zhang, S., Liu, Z., Li, H., Wang, Y., and Jiang, S. (2007). Characterization and expression of amphioxus ApoD gene encoding an archetype of vertebrate ApoD proteins. *Cell Biol Int* 31, 74-81.
- Warden, C. H., Diep, A., Taylor, B. A., and Lusis, A. J. (1992). Localization of the gene for apolipoprotein D on mouse chromosome 16. *Genomics* 12, 851-852.
- Watkins, S., Madison, J., Galliano, M., Minchiotti, L., and Putnam, F. W. (1994). Analbuminemia: three cases resulting from different point mutations in the albumin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9417-9421.
- Watson, G. S., Cholerton, B. A., Reger, M. A., Baker, L. D., Plymate, S. R., Asthana, S., Fishel, M. A., Kulstad, J. J., Green, P. S., Cook, D. G., *et al.* (2005). Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 13, 950-958.
- Weech, P. K., Provost, P., Tremblay, N. M., Camato, R. N., Milne, R. W., Marcel, Y. L., and Rassart, E. (1991). Apolipoprotein D--an atypical apolipoprotein. *Prog Lipid Res* 30, 259-266.
- Weisgraber, K. H., Rall, S. C., Jr., and Mahley, R. W. (1981). Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 256, 9077-9083.
- Willey, J. Z., and Elkind, M. S. (2010). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of central nervous system diseases. *Archives of neurology* 67, 1062-1067.
- Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div* 2, 11.
- Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., and Nishida, E. (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Current biology : CB* 16, 1171-1182.

- Yamashita, K., Upadhyay, S., Osada, M., Hoque, M. O., Xiao, Y., Mori, M., Sato, F., Meltzer, S. J., and Sidransky, D. (2002). Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 2, 485-495.
- Yang, C. L., Kurczab, T., Down, G., Kealey, T., and Langlands, K. (2005). Gene expression profiling of the ageing rat vibrissa follicle. *The British journal of dermatology* 153, 22-28.
- Yang, C. R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J. J., Kinsella, T. J., and Boothman, D. A. (2000). Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5907-5912.
- Yang, C. Y., Gu, Z. W., Blanco-Vaca, F., Gaskell, S. J., Yang, M., Massey, J. B., Gotto, A. M., Jr., and Pownall, H. J. (1994). Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry* 33, 12451-12455.
- Yeh, E. A., Collins, A., Cohen, M. E., Duffner, P. K., and Faden, H. (2004). Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 113, e73-76.
- Yoshida, K., Cleaveland, E. S., Nagle, J. W., French, S., Yaswen, L., Ohshima, T., Brady, R. O., Pentchev, P. G., and Kulkarni, A. B. (1996). Molecular cloning of the mouse apolipoprotein D gene and its upregulated expression in Niemann-Pick disease type C mouse model. *DNA Cell Biol* 15, 873-882.
- Zeng, C., Spielman, A. I., Vowels, B. R., Leyden, J. J., Biemann, K., and Preti, G. (1996). A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6626-6630.
- Zhang, L., Levi, E., Majumder, P., Yu, Y., Aboukameel, A., Du, J., Xu, H., Mohammad, R., Hatfield, J. S., Wali, A., *et al.* (2007). Transactivator of transcription-tagged cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 peptides suppress the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 6, 1661-1672.

- Zhang, S. X., Bentel, J. M., Ricciardelli, C., Horsfall, D. J., Haagensen, D. E., Marshall, V. R., and Tilley, W. D. (1998). Immunolocalization of apolipoprotein D, androgen receptor and prostate specific antigen in early stage prostate cancers. *J Urol* 159, 548-554.
- Zhao, Y., Chen, X., Yang, H., Zhou, L., Okoro, E. U., and Guo, Z. (2011). A novel function of apolipoprotein E: upregulation of ATP-binding cassette transporter A1 expression. *PLoS One* 6, e21453.